


Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

## Дифференциация штаммов *Bacillus anthracis* на основе SNP- и VNTR-полиморфизма геномов

Е.А. Анисимова , Н.А. Фахрутдинов, Д.А. Миргазов, Е.А. Додонова, И.А. Елизарова, М.Е. Горбунова, Н.И. Хаммадов, Л.И. Зайнуллин, К.А. Осянин

Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности, Научный городок-2, Казань, Россия


 elizaveta-real@mail.ru

**Аннотация.** Бактерии *Bacillus anthracis* являются возбудителем сибирской язвы. Для эпидемиологии этой инфекции имеет значение не только идентификация этиологического агента, но и выяснение закономерности его эволюции и распространения. Современные методы молекулярной биологии позволяют определить ряд генетических маркеров, пригодных для индикации и дифференциации штаммов *B. anthracis*. К таким маркерам относят VNTR-локусы – последовательности, организованные в геноме в виде tandemных повторов, а также SNP – отличия в последовательности ДНК в сравниваемых локусах размером в один нуклеотид. Целью настоящей работы была оценка эффективности совместного применения SNP-анализа и ПЦР-амплификации VNTR-локусов с анализом температуры плавления ампликонов высокого разрешения для идентификации и дифференциации штаммов возбудителя сибирской язвы. Исследовали семь штаммов *B. anthracis*, полученных из образцов почвы и трупов животных, в качестве референс-микроорганизма был вакцинный штамм *B. anthracis* СТИ-1. Для молекулярно-генетической характеристики данных бактерий проведен анализ 12 однонуклеотидных полиморфизмов, а также варибельности восьми VNTR-локусов, для определения различий в которых был впервые использован метод определения температур плавления ПЦР-продуктов в присутствии интеркалирующего красителя EvaGreen (ЗАО «Синтол», Россия). Для детекции SNP применен метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием двойных TaqMan-зондов. Обнаружено, что все изучаемые вирулентные штаммы, кроме *B. anthracis* № 1 и 3, по SNP-профилю не могут быть отнесены к какой-либо филогенетической подгруппе возбудителя сибирской язвы. Методический подход, включающий в себя анализ SNP- и VNTR-последовательностей, позволил дифференцировать между собой штаммы *B. anthracis* № 1–4, в то время как бактерии *B. anthracis* № 5–7 демонстрируют одинаковые SNP- и HRM-профили и, как следствие, формируют один кластер. Таким образом, показана принципиальная возможность использования рассмотренной в этой работе методики для предварительного анализа эпизоотической ситуации при вспышках сибирской язвы.


Ключевые слова: *Bacillus anthracis*; генотипирование; VNTR; SNP; HRM-анализ; эпидемиология сибирской язвы.

**Для цитирования:** Анисимова Е.А., Фахрутдинов Н.А., Миргазов Д.А., Додонова Е.А., Елизарова И.А., Горбунова М.Е., Хаммадов Н.И., Зайнуллин Л.И., Осянин К.А. Дифференциация штаммов *Bacillus anthracis* на основе SNP- и VNTR-полиморфизма геномов. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(6):560-567. DOI 10.18699/VJGB-22-68

## *Bacillus anthracis* strain differentiation based on SNP and VNTR loci

Е.А. Anisimova , N.A. Fakhrutdinov, D.A. Mirgazov, E.A. Dodonova, I.A. Elizarova, M.E. Gorbunova, N.I. Khammatov, L.I. Zainullin, K.A. Osyenin

Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Nauchny Gorodok-2, Kazan, Russia

 elizaveta-real@mail.ru

**Abstract.** *Bacillus anthracis* is the anthrax causative agent. For its epidemiology, it is important not only to identify the etiological agent but also to determine the patterns of its evolution and spread. Modern methods of molecular biology make it possible to detect a number of genetic markers suitable for indicating and differentiating the strains of *B. anthracis*, including the loci arranged as variable number tandem repeats (VNTRs) and SNPs, one nucleotide-sized differences in the DNA sequence of the loci being compared. The objective of the present study was to examine the effectiveness of SNP analysis and PCR amplification of VNTR loci combined with the high-resolution amplicon melting analysis for identification and differentiation of the anthrax agent strains. In the study, seven strains of *B. anthracis* obtained from soil samples and animal carcasses were investigated using vaccine strain STI-1 as a reference. For molecular genetic characterization of these bacteria, analysis of 12 SNPs and variability analysis of eight VNTR loci were carried out. To detect the differences between the strains, their PCR product melting points were measured in the presence of the EvaGreen (Sintol, Russia) intercalating dye. For SNP detection, a PCR assay with double TaqMan probes was applied. It was found that the studied virulent strains, except for *B. anthracis* No. 1 and 3, could not be attributed to any phylogenetic subgroup of the anthrax agents. The proposed method made it possible to differentiate four out of the seven

investigated strains. Strains No. 5–7 had identical SNP and HRM profiles and, as a result, formed a single cluster. Our investigation has confirmed that the proposed method can be successfully used for preliminary analysis of an epizootic situation in the case of anthrax.

Key words: *Bacillus anthracis*; genotyping; VNTR; SNP; HRM-analysis; epidemiology of anthrax.

**For citation:** Anisimova E.A., Fakhrutdinov N.A., Mirgazov D.A., Dodonova E.A., Elizarova I.A., Gorbunova M.E., Khamadov N.I., Zainullin L.I., Osyaniin K.A. *Bacillus anthracis* strain differentiation based on SNP and VNTR loci. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(6):560-567. DOI 10.18699/VJGB-22-68

## Введение

Бактерии *Bacillus anthracis* являются возбудителем особо опасной зоонозной инфекции – сибирской язвы. Несмотря на то что на сегодняшний день разработаны и достаточно широко внедрены эффективные меры по предупреждению возникновения и распространения этого заболевания, ежегодно во всем мире регистрируется от 2000 до 20000 случаев сибирской язвы (Pisarenko et al., 2019). Наибольшее количество случаев заражения в мире отмечено в странах Африки, Средней Азии и Южной Америки (Hugh-Jones, Blackburn, 2009; Kenefic et al., 2009), в России – на территории Сибири и Северного Кавказа (Логвин и др., 2017).

Все известные популяции *B. anthracis* крайне мономорфны и обладают клональной структурой (Achtman, 2008; Keim et al., 2009). Такое высокое генетическое сходство значительно затрудняет дифференциацию штаммов возбудителя сибирской язвы бактериологическими и серологическими методами. Решение этой задачи возможно при помощи молекулярно-генетических подходов. Для индикации и дифференциации штаммов *B. anthracis* наиболее перспективны методы, основанные на детекции областей с варибельным числом tandemных повторов (VNTR-локусы) и единичных нуклеотидных замен (SNP-локусы) в геноме возбудителя (Тимофеев и др., 2018; Wang et al., 2020).

Локусы SNP, по сравнению с VNTR-локусами, эволюционно наиболее стабильны, характеризуются низкой частотой мутаций, однако обладают меньшей разрешающей способностью. Поэтому детекция полиморфизмов в SNP-локусах возбудителя сибирской язвы часто служит начальным этапом в системе генотипирования, основанной на алгоритме совместного использования SNP- и VNTR-маркеров (Тимофеев и др., 2018). Широкое применение находит набор из 14 диагностически значимых «канонических» SNP (canSNP). Система дает возможность определить принадлежность исследуемого микроорганизма к той или иной филогенетической линии и, как следствие, сделать предположение о его географическом происхождении (Van Ert et al., 2007). Всего на сегодняшний день выделяют три филогенетические линии (А, В и С), которые в свою очередь образуют 14 филогенетических групп: А.Br.Ames, А.Br.Australia 94, А.Br.003/004, А.Br.Vollum, А.Br.005/006, А.Br.001/002, А.Br.Western, А.Br.WNA, А.Br.008/009, А.Br.011/009, В.Br.001/002, В.Br.KrugerB, В.Br.CNEVA и С.Br.A1055 (Тимофеев и др., 2018). Согласно данным литературы, штаммы, выделенные на территории Российской Федерации, принадлежат преимущественно к группе В.Br.001/002 линии В и группам А.Br.001/002 и А.Br.008/009 линии А, реже – к А.Br.Aust94 (Еременко и др., 2018; Котенева и др., 2019).

Для дальнейшей дифференциации штаммов в пределах каждого SNP-кластера используют мультилокусный анализ числа tandemных повторов (MLVA) (Тимофеев и др., 2018). Наиболее распространенная стратегия MLVA – проведение ПЦР-анализа с последующим разделением продуктов амплификации в агарозном или полиакриламидном геле, а также с применением капиллярного электрофореза (Бондарева и др., 2014). Наиболее точные результаты могут быть получены при проведении секвенирования ампликонов, однако существенным недостатком этого подхода является длительность его исполнения (от нескольких дней).

В настоящем исследовании для определения различий в VNTR-локусах, а именно количества tandemных повторов, применяли метод под названием HRM (high resolution melting), основанный на анализе температур плавления ампликонов в реальном времени. Используемый для HRM-анализа интеркалирующий краситель EvaGreen (ЗАО «Синтол», Россия) встраивается между двумя комплементарными нуклеотидами в двуспиральной молекуле ДНК. При возбуждении красителя светом длиной волны 490 нм он флуоресцирует по каналу детекции Fam. При денатурации ДНК и разрыве водородных связей флуоресценция отсутствует. Таким образом, при постепенном повышении температуры в амплификаторе и постоянной детекции возможно определить количество повторов по температуре плавления ампликонов. Последний подход имеет преимущество перед классическими MLVA-методами, поскольку не требует секвенирования или использования флуоресцентно-меченых зондов и, как следствие, позволяет провести детекцию различий в VNTR-локусах штаммов *B. anthracis* с меньшими финансовыми и временными затратами. Метод HRM-анализа продуктов ПЦР-амплификации ранее был предложен для SNP-генотипирования (Derzelle et al., 2011), однако для анализа VNTR-локусов не описан.

Целью работы стала оценка эффективности совместного применения SNP-анализа и ПЦР-амплификации VNTR-локусов с анализом температуры плавления ампликонов высокого разрешения для идентификации и дифференциации штаммов возбудителя сибирской язвы.

## Материалы и методы

В работе использовали семь штаммов *B. anthracis*, полученных из образцов почвы и трупов животных (табл. 1). В качестве референс-микроорганизма задействовали вакцинный штамм *B. anthracis* СТИ-1 из коллекции штаммов микроорганизмов (Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности (ФЦТРБ-ВНИВИ), Казань). Подготовку проб штаммов *B. anthracis* для дальнейших молекулярно-генетических

**Таблица 1.** Используемые в работе штаммы *B. anthracis*

Номер штамма	Место и год выделения	Источник выделения
1	Чечено-Ингушская АССР, 1971	Труп овцы
2	Таджикская ССР, 1971	Труп крупного рогатого скота
3	Курганская область, 1971	
4	г. Ульяновск, 2004	Почва (место падежа животного)
5		Труп свиньи
6	Республика Татарстан, 2004	Труп крупного рогатого скота
7	Республика Татарстан, 2008	
СТИ-1	Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов, 1980	Вакцинный штамм

исследований проводили согласно методическим указаниям (МУК 4.2.2941-11, 2011).

Геномную ДНК исследуемых микроорганизмов выделяли с помощью набора «ДНК-сорб В» (Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва) в соответствии с инструкцией производителя.

Для проведения SNP-анализа применяли метод полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) с помощью двойных TaqMan-зондов и праймеров, представленных ранее в работе (Van Ert et al., 2007). Реакционная смесь объемом 15 мкл содержала 125 мкМ каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата, 2.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 пМ каждого праймера и зонда, 10 нг ДНК-матрицы, 1.0 единицу Taq-полимеразы («Евроген», Россия), ddH<sub>2</sub>O (до 15 мкл). ПЦР-РВ проводили с использованием прибора Real-Time C1000 с оптическим блоком CFX96 (Bio-Rad, США) по следующей программе: первичная денатурация ДНК при 95 °С в течение 3 мин; далее 39 циклов: денатурация 95 °С – 10 с, отжиг олигонуклеотидов 50 °С – 30 с (детекция по каналу R6G/ROX), элонгация 72° С – 5 с. Определение точечной нуклеотидной замены в каждом

локусе выполняли, анализируя интенсивность флуоресценции по каждому каналу. Для численной оценки вариабельности SNP-локусов брали индекс аллельного полиморфизма (h) (Selander et al., 1986).

Для проведения MLVA применяли метод определения температур плавления ампликонов с помощью интеркалирующего красителя EvaGreen. Набор праймеров, использованных для амплификации VNTR-локусов, представлен в табл. 2.

Реакционная смесь для ПЦР-РВ объемом 15 мкл содержала 1.5 мкл 10×ПЦР-буфера с красителем EvaGreen («Синтол»), 2.5 мМ раствора MgCl<sub>2</sub> («Синтол»), 1.0 единицу Taq-полимеразы («Синтол»), 125 мкМ каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата, 5 пМ прямого и обратного праймера, 10 нг ДНК-матрицы, ddH<sub>2</sub>O (до 15 мкл). Амплификацию ДНК с последующим HRM-анализом осуществляли с помощью прибора Real-Time C1000 с оптическим блоком CFX96 (Bio-Rad) по следующей программе: начальная денатурация ДНК при 95 °С в течение 3 мин; далее 39 циклов: денатурация 95 °С – 10 с, отжиг олигонуклеотидов: 60 °С – 30 с (детекция по каналу FAM), элонгация: 72 °С – 10 с. Параметры плавления: диапазон температур от 65 до 95 °С, шаг 0.2 °С – 5 с. Графический анализ кривых плавления продуктов амплификации выполняли в программе CFX Manager™ (Bio-Rad). Разделение ампликонов проводили в нативном 8 % полиакриламидном геле (ПААГ) (Sambrook et al., 1989).

Биоинформационный анализ геномов *B. anthracis* осуществляли с помощью программ Vector NTI 9.1 и баз данных ресурсов NCBI (<https://www.ncbi.gov>).

## Результаты

### Разработка и апробация

Для молекулярного типирования штаммов *Bacillus anthracis* использовали расширенный протокол, включающий детекцию 12 SNP-локусов, условно обозначенных как A.Br.001, A.Br.003, A.Br.004, A.Br.006, A.Br.007, A.Br.008, A.Br.009, B.Br.001, B.Br.002, B.Br.003, B.Br.004 и A/B.Br.001 (Van Ert et al., 2007), и анализ восьми VNTR-локусов (VtrA, VtrB1, VtrB2, VtrC1, VtrC2, CG3, pX01 и

**Таблица 2.** Синтетические олигонуклеотиды, использованные в работе для амплификации VNTR-локусов

Локус	ID: Локализация в геноме, п. о.	Нуклеотидная последовательность праймера, 5'→3'		Ожидаемая длина ампликона (без повторов), п. о.
		Прямой	Обратный	
VrrA	CP076222.1: 4103374–4103699	CACAАCTACCACCGATGGCAC	GCGCGTTTCGTTTGATTCATAC	266
VrrB1	CP054800.1: 3380187–3380415	ATAGGTGGTTTTCCGCAAGTTATTC	GATGAGTTTGATAAAGAATAGCCTGTG	211
VrrB2	CP054800.1: 3380389–3380541	CACAGGCTATTCTTTATCAAАCTCATC	CCCAAGGTGAAGATTGTTGTTGA	135
VrrC1	CP054816.1: 1937943–1938522	GAAGCAAGAAAGTGATGTAGTGGAC	CATTTCTCAAGTGCTACAGGTTC	544
VrrC2	CP054816.1: 1937447–1937978	CCAGAAGAAGTGGAACTGTAGCAC	GTCTTTCCATTAATCGCGCTCTATC	460
CG3	CP054816.1: 4931009–4931169	CCATGTCGTTTTACTTCTCTCTCCAATAC	AGTCATTGTTCTGTATAAAGGGCAT	151
pX01	FR872876	CAATTTATTAACGATCAGATTAAGTTCA	TCTAGAATTAGTTGCTTCATAATGGC	108
pX02	FR872886	TCATCTCTTTAAGTCTTGGGT	GTGTGATGAACTCCGACGACA	123

**Таблица 3.** Результаты SNP-анализа исследуемых штаммов *B. anthracis*

Номер штамма	Локус													Филогенетическая группа
	A.Br.001	A.Br.003	A.Br.004	A.Br.006	A.Br.007	A.Br.008	A.Br.009	B.Br.001	B.Br.002	B.Br.003	B.Br.004	A/B.Br.001		
СТИ-1	T	G	T	A	T	T	A	T	G	G	T	A	A.Br.008/009	
1	T	-	C	A	T	-	A	T	G	G	T	A	A.Br.003/004	
2	T	-	C	A	C	-	A	T	G	G	T	A	-	
3	T	-	T	A	T	-	A	T	G	G	T	A	A.Br.008/009	
4	T	-	C	A	C	-	A	T	G	G	T	A	-	
5	T	-	C	C	T	-	A	T	T	A	T	A	-	
6	T	-	C	C	T	-	A	T	T	A	T	A	-	
7	T	-	C	C	T	-	A	T	T	A	T	A	-	

**Таблица 4.** Характеристика VNTR-локусов бактерий *B. anthracis* СТИ-1

Локус	Размер локуса, п. о.	Длина повтора, п. о.	Нуклеотидная последовательность повтора	Количество повторов	Температура плавления ампликона, °C
VrrA	314	12	tatcaacaaca	4	84.5
VrrB1	229	9	caaggtcac	2	86.2
VrrB2	162	9	caatatcaa	3	85.7
VrrC1	616	36	cttctctgactcttctgttccgcaattacttcta	2	82
VrrC2	604	72	ctacgaccggtgcttctctgcaactggtgttctctacaatcggtgttctctacaactgattgttct	2	85
CG3	156	5	tatta	1	75.2
pX01	156	3	aat	16	74.2
pX02	-	2	at	-	-

pX02) (Keim et al., 2000). Апробацию разработанного подхода к генотипированию штаммов возбудителя сибирской язвы провели на вакцинном штамме *B. anthracis* СТИ-1.

По результатам SNP-анализа, приведенным в табл. 3, можно сделать вывод о конфигурации точечных нуклеотидных замен в исследуемых 12 локусах штамма *B. anthracis* СТИ-1. Обнаружено, что за исключением двух локусов (A.Br.003 и A.Br.008), полученный в этом исследовании SNP-профиль для бактерий *B. anthracis* СТИ-1 соотносится с представленными в литературе данными об однонуклеотидных полиморфизмах для того же штамма (Афанасьев и др., 2014; Еременко и др., 2018). Отметим, что *sanSNP* достаточно консервативны и, как известно, имеют низкую скорость мутаций (Тимофеев и др., 2018). Достоверность обнаруженных для *B. anthracis* СТИ-1 нетипичных однонуклеотидных замен в локусах A.Br.003 и A.Br.008 требует дальнейшего подтверждения, в частности секвенированием. Поэтому на данном этапе работы локусы A.Br.003 и A.Br.008 были исключены из диагностической *sanSNP*-панели, пригодной для дифференциации изучаемых штаммов.

Для проведения MLVA применяли метод классической ПЦР с последующим разделением ампликонов в ПААГ. Этот метод позволил определить только примерные размеры семи анализируемых VNTR-локусов штамма *B. anthracis* СТИ-1: VrrA – 300 п. о., VrrB1 – 250 п. о., VrrB2 –

190 п. о., VrrC1 – 700 п. о., VrrC2 – 600 п. о., CG3 – 160 п. о., pX01 – 160 п. о. Продукт амплификации локуса, локализованного на плазмиде капсулообразования pX02, не детектирован. Отсутствие плазмиды pX02 является характерным признаком штамма *B. anthracis* СТИ-1 (Афанасьев и др., 2014).

Точный размер амплифицируемых VNTR-участков ДНК *B. anthracis* СТИ-1, а также размер нуклеотидных повторов в них определили *in silico*. С помощью программы Vector NTI 9.1 нуклеотидную последовательность хромосомной ДНК бактерий *B. anthracis* СТИ-1 (GenBank CP066168) ограничили соответствующими праймерами (см. табл. 2). Результаты, полученные после биоинформационного анализа генома *B. anthracis* СТИ-1, приведены в табл. 4. Полная нуклеотидная последовательность плазмиды pX01 этого штамма отсутствует в базе данных GenBank. Поэтому количество tandemных повторов в данном локусе определили как разницу между молекулярной массой ампликона и размером амплифицируемого фрагмента «без повторов», которую делили на количество нуклеотидов в варибельной области. С помощью электрофореза обнаружено, что размеры локусов CG3 и pX01 бактерий *B. anthracis* СТИ-1 идентичны между собой. Исходя из этого факта, при расчете количества повторов, локализованных на плазмиде pX01, использовали молекулярную массу локуса CG3.

**Таблица 5.** Температуры плавления ПЦР-продуктов, полученных после амплификации VNTR-локусов исследуемых штаммов *B. anthracis*

Номер штамма	Локус							
	VrrA1	VrrB1	VrrB2	VrrC1	VrrC2	CG3	pXO1	pXO2
1	84.6	86.0	85.4	84.2	83.6	75.6	74.6	78.2
2	84.6	86.0	83.0	84.0	83.4	75.0	74.2	77.8
3	84.2	85.8	85.4	84.2	83.4	75.0	74.2	78.2
4	85.2	86.0	85.4	84.2	83.6	75.2	74.6	78.4
5	85.0	85.8	85.8	84.0	83.4	75.2	74.6	78.2
6	85.0	86.0	85.8	84.0	83.6	75.2	74.6	78.4
7	85.0	86.0	86.0	84.0	83.6	75.2	74.8	78.4

Определены пики плавления ПЦР-РВ-продуктов амплифицируемых VNTR-локусов штамма *B. anthracis* СТИ-1 (см. табл. 4). ПЦР-РВ проводили с использованием красителя EvaGreen в восьми репликах. Обнаружено, что разница между репликами для большинства анализируемых локусов составляет 0.2 °С. Поэтому для дальнейшей дифференцировки штаммов сибирской язвы на основе разниц температур плавления VNTR-локусов допустимым отличием в показаниях приняли значения от 0.2 °С.

#### Анализ однонуклеотидных полиморфизмов

Результаты молекулярно-генетического анализа SNP-локусов, исследованных в данной работе, вирулентных штаммов *B. anthracis* представлены в табл. 2. Обнаружено, что SNP-анализ не выявил различий в пяти локусах: A.Br001, A.Br005, A.Br009, B.Br001 и A/B.Br001. Значения индекса варибельности (h) для других семи SNP-локусов находились в диапазоне от 0.12 до 0.4.

По полученным результатам изученные штаммы распределены в четыре кластера. Самый большой кластер формируют три штамма, выделенные на территории Республики Татарстан (*B. anthracis* № 6, 7) в 2008 и 2014 гг., и г. Ульяновска (*B. anthracis* № 5) – в 2004 г. Во второй кластер входят штаммы № 2 и 4, полученные в Таджикской ССР в 1972 г. и Ульяновске в 2004 г. соответственно. Штаммы *B. anthracis* № 1 и 3, обнаруженные на территории Чечено-Ингушской АССР в 1971 г. и Курганской области – в 1972 г. соответственно, формируют еще два кластера.

По данным SNP-типирования установили принадлежность штамма *B. anthracis* № 1 к филогенетической подгруппе A.Br.003/004. Обнаружено, что бактерии *B. anthracis* № 3, как и референсный штамм *B. anthracis* СТИ-1, могут быть отнесены к филогенетической линии A.Br.011/009. У остальных исследуемых микроорганизмов полученные SNP-профили не характерны для какой-либо из выделенных ранее филогенетических подгрупп штаммов *B. anthracis*.

#### Мультилокусный анализ числа tandemных повторов

Для дифференцировки различий в VNTR-локусах использовали температуры плавления ампликонов (табл. 5). Температура плавления полученных ПЦР-фрагментов после амплификации варибельных локусов зависит от

их нуклеотидного состава, а именно от количества tandemных повторов: чем их больше, тем выше температура плавления.

Установлено, что полученные после амплификации локуса VrrA1 кривые плавления штаммов *B. anthracis* № 1 и 2 идентичны кривой плавления того же локуса референсного штамма *B. anthracis* СТИ-1 и, вероятно, содержат в локусе VrrA1 четыре tandemных повтора. Четыре штамма *B. anthracis* (№ 4–7) демонстрируют более высокую температуру плавления ампликонов в сравнении с *B. anthracis* СТИ-1, что говорит о большем количестве tandemных повторов в локусе VrrA1. В свою очередь, среди исследованных штаммов *B. anthracis* № 3 имеет самую низкую температуру плавления ампликона VrrA1 и, как следствие, отличается наименьшим количеством повторов в локусе VrrA1.

Бактерии *B. anthracis* (№ 5–7) и СТИ-1 обладают идентичными кривыми плавления ампликонов VrrB2 и содержат в локусе VrrB2 характерные для *B. anthracis* СТИ-1 три tandemных повтора. В соответствии с данными, представленными в табл. 5, следует, что остальные исследованные штаммы имеют в этом локусе меньшее количество повторов – *B. anthracis* (№ 1, 3, 4, 6), вероятно, два, а *B. anthracis* № 2 – один tandemный повтор.

Полученные результаты о кривых плавления ампликонов CG3 свидетельствуют о том, что все штаммы, кроме *B. anthracis* № 1, содержат в локусе CG3 один tandemный повтор, характерный для *B. anthracis* СТИ-1. Бактерии *B. anthracis* № 1, вероятно, несут в этом локусе несколько повторов.

Детектировано, что бактерии *B. anthracis* № 2 и 3 характеризуются идентичными с референсным штаммом температурами ампликона pXO1. Исходя из данного факта следует, что эти бактерии содержат на плазмиде pXO1 16 tandemных повторов, а остальные исследованные штаммы *B. anthracis* – более 16.

Температуры плавления ПЦР-продуктов, полученные после амплификации локусов VrrB1, VrrC1 и VrrC2, не различались у изучаемых штаммов *B. anthracis*, таким образом, число повторов на данных участках ДНК идентично. Бактерии *B. anthracis* СТИ-1 содержат в этих локусах по два tandemных повтора. Исследуемые микроорганизмы демонстрируют более низкую температуру плавления ампликонов VrrB1 и VrrC2 в сравнении с референсным

штаммом и, вероятно, несут в этих локусах один повтор. Что касается локуса VtrC1, у всех изученных штаммов *B. anthracis* температура плавления ПЦР-продуктов, полученная после амплификации данного локуса, превышала значение, отмеченное для *B. anthracis* СТИ-1. Следовательно, эти штаммы несут в локусе VtrC1 три или более tandemных повтора. Количество повторов в локусе rXO2 для исследованных штаммов *B. anthracis* установить невозможно ввиду отсутствия этого маркера у бактерий *B. anthracis* СТИ-1.

Таким образом, по результатам анализа температур плавления ампликонов установлено, что штамм *B. anthracis* № 1 отличается от остальных бактерий по количеству tandemных повторов в локусе CG3, штамм № 2 – в локусах VtrB2 и rXO2, а штамм № 3 – в локусе VtrA1. Для бактерий *B. anthracis* № 1–3 выявлен уникальный профиль температур плавления ПЦР-продуктов амплификации VNTR-локусов, позволяющий различить их между собой. Три штамма *B. anthracis* (№ 5–7) демонстрируют один и тот же профиль температур плавления продуктов амплификации VNTR-локусов, поэтому их можно объединить в один кластер. Схожий с данным кластером профиль температур плавления детектирован для бактерий *B. anthracis* № 4, которые отличались от штаммов № 5–7 только по числу tandemных повторов в локусе VtrB2.

## Обсуждение

За последние годы отечественными и зарубежными исследователями опубликовано значительное количество работ, посвященных разработке приемлемых подходов к генотипированию штаммов возбудителя сибирской язвы (Le Flèche et al., 2001; Keim et al., 2004; Van Ert et al., 2007; Gierczynski et al., 2009; Еременко и др., 2012; Афанасьев и др., 2014). Большинство доступных методов генотипирования *B. anthracis* основано на полиморфизме tandemных повторов или точечных мутаций их генома. Ряд исследователей считают, что тест-системы, построенные на сочетании генетических маркеров, отличающихся своей дискриминационной способностью и стабильностью, наиболее эффективны для дифференциации штаммов *B. anthracis* (Keim et al., 2004; Chang et al., 2007; Афанасьев и др., 2014). SNP-локусы являются более стабильными, но имеют в сравнении с VNTR невысокий индекс разнообразия. Поэтому при совместном использовании данных локусов рекомендуется сначала с помощью canSNP установить принадлежность изучаемых штаммов *B. anthracis* к той или иной филогенетической группе, после чего дифференцировать штаммы внутри каждого canSNP-кластера посредством MLVA-анализа (Тимофеев и др., 2018).

Универсальным подходом к анализу VNTR-локусов остается их ПЦР-амплификация с последующей визуализацией полученных ампликонов в агарозном или полиакриламидном геле (Jackson et al., 1997, 1999; Keim et al., 2000). Этот метод может быть эффективен для дифференциации нуклеотидных повторов размером более 10 п. о. (VtrA1 – 12 п. о., VtrC1 – 36 п. о., VtrC2 – 72 п. о.), но не подходит для разделения повторов в 2–3 нуклеотида (VtrB1 и VtrB2 – 9 п. о., CG3 – 5 п. н., rXO1 – 3 п. о., rXO2 – 2 п. о.). Размер большинства используемых в на-

шей работе повторов не превышает 10 п. о., следовательно, применение электрофореза для разделения изучаемых штаммов не представляется возможным. В настоящем исследовании для дифференциации аллельных вариантов VNTR-локусов, а именно количества tandemных повторов, применяли альтернативный метод – HRM-анализ. Он широко используется при генотипировании, в частности для обнаружения мутаций, полиморфизмов и эпигенетических различий в образцах двуцепочечной ДНК (Graham et al., 2005; Margraf et al., 2006). Применение HRM-анализа также позволяет проводить индикацию и дифференциацию штаммов бруцелл (Winchell et al., 2010).

Согласно данным литературы, штаммы *B. anthracis*, циркулирующие на неблагоприятных по сибирской язве территориях Российской Федерации, преимущественно относятся к A.Br.001/002, A.Br.008/009, B.Br.001/002 и A.Br.Aust94 генотипам (Еременко и др., 2018; Кравец и др., 2018; Котенева и др., 2019). В частности, штаммы, выделенные на административных территориях Северного Кавказа, как правило, распределяются по canSNP-кластерам A.Br.008/009 и A.Br.Aust94. В Республике Дагестан также встречается генотип B.Br.001/002 (Котенева и др., 2019). На территориях Сибири и Дальнего Востока чаще других выявляются штаммы, относящиеся к филогенетическим группам A.Br.001/002, A.Br.008/009 и B.Br.001/002 (Еременко и др., 2018; Кравец и др., 2018).

Отметим, что, по мнению ряда исследователей, canSNP-генотипы, вероятно, не ограничиваются описанными на сегодняшний день 14 генотипами (Афанасьев и др., 2014; Тимофеев и др., 2018). Так, в работе М.В. Афанасьева с коллегами (2014) обнаружено три дополнительные филогенетические подгруппы. Действительно, по результатам проведенного нами генетического типирования семи культур *B. anthracis* методами SNP- и MLVA-анализа установлено, что все изучаемые микроорганизмы, кроме *B. anthracis* № 1 и 3, по SNP-профилю не входили в состав основных филогенетических canSNP-подгрупп. Филогенетическая линия A.Br.003/004, к которой отнесли штамм *B. anthracis* № 1, включает преимущественно штаммы с американских континентов (Еременко и др., 2018). Среди всех исследуемых штаммов наиболее характерный для российских изолятов профиль однонуклеотидных полиморфизмов был у штамма *B. anthracis* № 3, выделенного на территории Курганской области.

Исследованные в этой работе штаммы возбудителя сибирской язвы, как правило, организованы в SNP-кластеры по своему географическому происхождению. Исключением считаются имеющие общий SNP-профиль микроорганизмы *B. anthracis* № 2 и *B. anthracis* № 4, изолированные на территории бывшей Таджикской ССР в 1972 г. и г. Ульяновска – в 2004 г. соответственно. С помощью HRM-анализа ПЦР-продуктов амплификации VNTR-локусов установлено, что данные бактерии отличаются по числу повторов в локусах VtrA1, VtrA2, rXO1 и rXO2 и, как следствие, могут быть дифференцированы между собой. Можно предположить, что эти микроорганизмы имеют общее географическое происхождение, однако с течением времени произошла их дивергенция, в частности под действием миграционных и торговых потоков. Действительно, согласно литературным данным,

VNTR-локусы характеризуются высокой скоростью мутаций (от  $10^{-5}$  до  $10^{-4}$  на поколение) (Keim et al., 2004; Birdsell et al., 2012; Thierry et al., 2014) и, в сравнении с SNP-локусами, являются маркерами более поздней эволюции штаммов *B. anthracis*.

Полученные для остальных исследованных штаммов HRM-профили формируют паттерны, полностью соотносящиеся с SNP-профилями. Таким образом, расширенный протокол, включающий в себя анализ SNP и VNTR, позволяет дифференцировать четыре штамма *B. anthracis*. Штаммы *B. anthracis* № 5–7 демонстрируют одинаковые SNP- и HRM-профили, и, как следствие, формируют один кластер.

Таким образом, применение HR-анализа в нашей работе позволило дифференцировать исследованные штаммы между собой и определить их в кластеры. Установлен размер повторов в локусах, температура плавления ПЦР-продуктов которых была идентична температурам плавления ампликонов тех же VNTR-локусов референсного штамма *B. anthracis* СТИ-1. Однако на сегодняшний день точный размер tandemных повторов может быть определен только с помощью секвенирования. Поэтому в дальнейшем необходимо осуществить секвенирование VNTR-локусов исследованных в данной работе штаммов. Совместное использование HRM- и секвенс-анализа, на наш взгляд, в перспективе может привести к созданию базы данных кривых плавления VNTR-локусов, соотносящихся с их размером.

## Заключение

Проведенные исследования показали, что использование метода HRM для анализа ПЦР-продуктов VNTR-локусов имеет большое практическое значение. В частности, этот метод можно применять для быстрой предварительной дифференциации штаммов *B. anthracis*, принадлежащих к одной вспышке инфекционного заболевания. Для наиболее результативной и информативной индикации и дифференциации штаммов возбудителя сибирской язвы нами предлагается следующий алгоритм анализа: 1) распределение исследуемых штаммов по филогенетическим подгруппам с помощью SNP-типирования; 2) дифференциация штаммов внутри каждого SNP-кластера методом MLVA с применением HRM-анализа; 3) MLVA-типирование с использованием классической ПЦР, электрофореза и секвенирования дифференцированных таким образом штаммов. Однако для более детальных ответов на вопросы о применении данной стратегии генотипирования необходимо проведение более масштабных исследований.

## Список литературы / References

Афанасьев М.В., Кравец Е.В., Дугаржапова З.Ф., Такайшвили В.Е., Половинкина В.С., Балахонов С.В. Сравнительный мультилокусный VNTR- и SNP-анализ вакцинных штаммов *Bacillus anthracis*. *Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология*. 2014;2:36-40.  
[Afanas'ev M.V., Kravets E.V., Dugarzhapova Z.F., Takaishvili V.E., Polovinkina V.S., Balakhonov S.V. Comparative multilocus VNTR and SNP analysis of *Bacillus anthracis* vaccine strains. *Mol. Genet. Microbiol. Virol.* 2014;29(2):86-92. DOI 10.3103/S0891416814020025.]

Бондарева О.С., Савченко С.С., Ткаченко Г.А., Абуева А.И., Муратова Ю.О., Антонов В.А. Современные подходы к генотипированию возбудителей особо опасных инфекций. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2014;19(1):34-44.  
[Bondareva O.S., Savchenko S.S., Tkachenko G.A., Abueva A.I., Muratova Yu.O., Antonov V.A. Modern approaches to the genotyping of causative agents of particularly dangerous infections. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases*. 2014;1:34-44. (in Russian)]

Еременко Е.И., Писаренко С.В., Аксенова Л.Ю., Рязанова А.Г., Жиров А.М., Семенова О.В., Бобрышева О.В., Ковалев Д.А., Куличенко А.Н. Филогенетика, эволюция и филогеография *Bacillus anthracis*. *Бактериология*. 2018;3(2):57-63. DOI 10.20953/2500-1027-2018-2-57-63.  
[Eremenko E.I., Pisarenko S.V., Aksenova L.Yu., Ryazanova A.G., Zhirov A.M., Semenova O.V., Bobrysheva O.V., Kovalev D.A., Kulichenko A.N. Phylogenetics, evolution, and phylogeography of *Bacillus anthracis*. *Bakteriologiya = Bacteriology*. 2018;3(2):57-63. DOI 10.20953/2500-1027-2018-2-57-63. (in Russian)]

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. *Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология*. 2012;2:26-29.  
[Eremenko E.I., Ryazanova A.G., Tsygankova O.I., Tsygankova E.A., Buravtseva N.P., Kulichenko A.N. Genotype diversity of *Bacillus anthracis* strains isolated from the Caucasus region. *Mol. Genet. Microbiol. Virol.* 2012;27(2):74-78. DOI 10.3103/S0891416812020024.]

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. *Мед. вестник Северного Кавказа*. 2019;14(4):580-582. DOI 10.14300/mnnc.2019.14144.  
[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 diversity of *Bacillus anthracis* strains isolated in North Caucasus and in neighboring areas. *Meditsinskiy Vestnik Severnogo Kavkaza = Medical News of North Caucasus*. 2019;14(4):580-582. DOI 10.14300/mnnc.2019.14144. (in Russian)]

Кравец Е.В., Дугаржапова З.Ф., Такайшвили В.Е., Иванова Т.А., Чеснокова М.В., Балахонов С.В. Изучение биологических и молекулярно-генетических свойств штаммов *Bacillus anthracis*, изолированных на территории Сибири и Дальнего Востока (1959–2013 гг.). *Проблемы особо опасных инфекций*. 2018;3:54-59. DOI 10.21055/0370-1069-2018-3-54-59.  
[Kravets E.V., Dugarzhapova Z.F., Takaishvili V.E., Ivanova T.A., Chesnokova M.V., Balakhonov S.V. Biological and molecular properties of *Bacillus anthracis* strains isolated in Siberia and the Russian Far East (1959–2013). *Problemy Osobo Opasnykh Infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2018;3:54-59. DOI 10.21055/0370-1069-2018-3-54-59. (in Russian)]

Логвин Ф.В., Кондратенко Т.А., Водяницкая С.Ю. Сибирская язва в мире, странах СНГ и Российской Федерации (обзор литературы). *Мед. вестник Юга России*. 2017;8(3):17-22. DOI 10.21886/2219-8075-2017-8-3-17-22.  
[Logvin F.V., Kondratenko T.A., Vodyanitskaya S.Y. Anthrax in the world, CIS, and Russian Federation (literature review). *Meditsinskiy Vestnik Yuga Rossii = Medical Herald of the South of Russia*. 2017;8(3):17-22. DOI 10.21886/2219-8075-2017-8-3-17-22.]

МУК 4.2.2941-11 Порядок организации и проведения лабораторной диагностики сибирской язвы для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней: Методические указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011.  
[MUK 4.2.2941-11 Organization and Protocol of Anthrax Laboratory Diagnostics in Municipal, Regional, and Federal Laboratories:

- Methodological Guidelines. Moscow: Rospotrebnadzor Federal Hygiene and Epidemiology Center, 2011. (in Russian)]
- Тимофеев В.С., Бахтеева И.В., Дятлов И.А. Генотипирование *Bacillus anthracis* и близкородственных микроорганизмов. *Генетика*. 2018;54(1):3-14. DOI 10.7868/S0016675818010113. [Timofeev V.S., Bakhteeva I.V., Dyatlov I.A. Genotyping of *Bacillus anthracis* and closely related microorganisms. *Russ. J. Genet.* 2018;54(1):1-11. DOI 10.1134/S1022795418010118.]
- Achtman M. Evolution, population structure, and phylogeography of genetically monomorphic bacterial pathogens. *Annu. Rev. Microbiol.* 2008;62:53-70. DOI 10.1146/annurev.micro.62.081307.162832.
- Birdsell D.N., Pearson T., Price E.P., Hornstra H.M., Nera R.D., Stone N., Gruendike J., Kaufman E.L., Pettus A.H., Hurbon A.N., Buchhagen J.L., Harms N.J., Chanturia G., Gyuranecz M., Wagner D.M., Keim P.S. Melt analysis of mismatch amplification mutation assays Melt-MAMA: a functional study of a cost-effective SNP genotyping assay in bacterial models. *PLoS One*. 2012;7(3):e32866. DOI 10.1371/journal.pone.0032866.
- Chang C.H., Chang Y.C., Underwood A. VNTRDB: a bacterial variable number tandem repeat locus database. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35(Database issue):D416-D421. DOI 10.1093/nar/gkl872.
- Derzelle S., Laroche S., Le Flèche P., Hauck Y., Thierry S., Vergnaud G., Madani N. Characterization of genetic diversity of *Bacillus anthracis* in France by using high-resolution melting assays and multilocus variable-number tandem-repeat analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2011;49(12):4286-4292. DOI 10.1128/JCM.05439-11.
- Gierczynski R., Jackubczak A., Jagielski M. Extended multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis of *Bacillus anthracis* strains isolated in Poland. *Pol. J. Microbiol.* 2009;58(1):3-7.
- Graham R., Liew M., Meadows C., Lyon E., Wittwer C.T. Distinguishing different DNA heterozygotes by high-resolution melting. *Clin. Chem.* 2005;51(7):1295-1298. DOI 10.1373/clinchem.2005.051516.
- Hugh-Jones M., Blackburn J. The ecology of *Bacillus anthracis*. *Mol. Aspects Med.* 2009;30(6):356-367. DOI 10.1016/j.mam.2009.08.03.
- Jackson P.J., Hill K.K., Laker M.T., Ticknor L.O., Keim P. Genetic comparison of *Bacillus anthracis* and its close relatives using amplified fragment length polymorphism and polymerase chain reaction analysis. *J. Appl. Microbiol.* 1999;87(2):263-269. DOI 10.1046/j.1365-2672.1999.00884.x.
- Jackson P.J., Walthers E.A., Kalif A.S., Richmond K.L., Adair D.M., Hill K.K., Kuske C.R., Andersen G.L., Wilson K.H., Hugh-Jones M., Keim P. Characterization of the variable-number tandem repeats in *virA* from different *Bacillus anthracis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997;63(4):1400-1405. DOI 10.1128/aem.63.4.1400-1405.1997.
- Keim P., Gruendike J.M., Klevytska A.M., Schupp J., Challacombe J., Okinaka R. The genome and variation of *Bacillus anthracis*. *Mol. Aspects Med.* 2009;30(6):397-405. DOI 10.1016/j.mam.2009.08.005.
- Keim P., Price L.B., Klevytska A.M., Smith K.L., Schupp J.M., Okinaka R., Jackson P.J., Hugh-Jones M.E. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* 2000;182(10):2928-2936. DOI 10.1128/JB.182.10.2928-2936.2000.
- Keim P., Van Ert M.N., Pearson T., Vogler A.J., Huynh L.Y., Wagner D.M. Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales. *Infect. Genet. Evol.* 2004;4(3):205-213. DOI 10.1016/j.meegid.2004.02.005.
- Kenefic L., Pearson T., Okinaka R., Schupp J., Wagner D., Ravel J., Hoffmaster A., Trim C.P., Chung W.-K., Beaudry J.A., Foster J., Mead J., Keim P. Pre-Columbian origins for North American anthrax. *PLoS One*. 2009;4(3):e4813. DOI 10.1371/journal.pone.0004813.
- Le Flèche P., Hauck Y., Onteniente L., Prieur A., Denoeud F., Rammisse V., Sylvestre P., Benson G., Rammisse F., Vergnaud G. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. *BMC Microbiol.* 2001;1:2. DOI 10.1186/1471-2180-1-2.
- Margraf R.L., Mao R., Highsmith W.E., Holtegaard L.M., Wittwer C.T. Mutation scanning of the RET protooncogene using high-resolution melting analysis. *Clin. Chem.* 2006;52(1):138-141. DOI 10.1373/clinchem.2005.052951.
- Pisarenko S.V., Eremenko E.I., Ryazanova A.G., Kovalev D.A., Buravtseva N.P., Aksenova L.Yu., Dugarzhapova Z.F., Evchenko A.Yu., Kravets E.V., Semenova O.V., Bobrisheva O.V., Kuznetsova I.V., Golovinskaya T.M., Volynkina A.S., Balakhonov S.V., Kulichenko A.N. 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. DOI 10.1186/s12864-019-6060-z.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Selander R.K., Caugant D.A., Ochman H., Musser J.M., Gilmour M.N., Whittam T.S. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* 1986;51(5):873-884. DOI 10.1128/aem.51.5.873-884.1986.
- Thierry S., Tourterel C., Le Flèche P., Derzelle S., Dekhil N., Mendy Ch., Colaneri C., Vergnaud G., Madani N. 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 10.1371/journal.pone.0095131.
- Van Ert M.N., Easterday W.R., Huynh L.Y., Okinaka R.T., Hugh-Jones M.E., Ravel J., Zanecki S.R., Pearson T., Simonson T.S., U'Ren J.M., Kachur S.M., Leadem-Dougherty R.R., Rhoton S.D., Zinser G., Farlow J., Coker P.R., Smith K.L., Wang B., Kenefic L.J., Fraser-Liggett C.M., Wagner D.M., Keim P. Global genetic population structure of *Bacillus anthracis*. *PLoS One*. 2007;2(5):e461. DOI 10.1371/journal.pone.0000461.
- Wang D., Wang B., Zhu L., Wu S., Lyu Y., Feng E., Pan C., Jiao L., Cui Y., Liu X., Wang H. Genotyping and population diversity of *Bacillus anthracis* in China based on MLVA and canSNP analysis. *Microbiol. Res.* 2020;233:126414. DOI 10.1016/j.micres.2020.126414.
- Winchell J.M., Wolff B.J., Tiller R., Bowen M.D., Hoffmaster A.R. Rapid identification and discrimination of *Brucella* isolates by use of real-time PCR and high-resolution melt analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2010;48(3):697-702. DOI 10.1128/JCM.02021-09.

#### ORCID ID

E.A. Anisimova orcid.org/0000-0002-0416-6193  
N.A. Fakhrutdinov orcid.org/0000-0002-6522-7930  
D.A. Mirgazov orcid.org/0000-0002-4709-314X  
E.A. Dodonova orcid.org/0000-0002-6919-4064

I.A. Elizarova orcid.org/0000-0003-0802-435X  
M.E. Gorbunova orcid.org/0000-0002-0707-2117  
N.I. Khammadoev orcid.org/0000-0001-5669-1486  
L.I. Zainullin orcid.org/0000-0002-3086-4921  
K.A. Osyanin orcid.org/0000-0003-2763-8605

**Благодарности.** Исследование выполнено при поддержке Федерального центра токсикологической, радиационной и биологической безопасности.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 24.03.2022. После доработки 28.06.2022. Принята к публикации 28.06.2022.