

Сведения об авторах:

Трусова Ирина Николаевна (Trusova Irina Nikolaevna), мл. науч. сотр. ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского», irina-trusova@yandex.ru; 123098 Москва, ул. Гамалеи, 16; **Бутен-**

ко Александр Михайлович (Butenko Aleksandr Mikhaylovich), доктор биол. наук, проф., зав. лаб. биологии и индикации арбовирусов ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского», arboelisa@mail.ru; 123098 Москва, ул. Гамалеи, 16.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

УДК 579.852.11:579.253.4

А.В. Липницкий, И.А. Баркова, В.А. Антонов, А.М. Барков, А.В. Новоженина

К ВОПРОСУ ОБ ЭВОЛЮЦИИ СИБИРЕЯЗВЕННОГО МИКРОБА

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7

*Цель обзора – анализ результатов исследований по характеристике штаммов бацилл из группы *B. cereus sensu lato*, вызывающих атраксоподобные заболевания человека и некоторых видов животных. Факты свидетельствуют о том, что наряду с эволюцией сибиреязвенного микроба, приведшей к приобретению основных факторов вирулентности – плазмид *pXO1* и *pXO2*, возможно возникновение штаммов бацилл с аналогичными *B. anthracis*-плазмидами вирулентности, но сохраняющих свойства *B. cereus sensu stricto*. Причины и условия появления таких штаммов пока не установлены.*

Ключевые слова: эволюция *B. anthracis*, *B. cereus*, плазмиды *pXO1* и *pXO2*

A.V. Lipnitskiy, I. A. Barkova, V. A. Antonov, A. M. Barkov, A. V. Novozhenina

TO THE QUESTION OF THE EVOLUTION OF BACILLUS ANTHRACIS MICROBE

Volgograd Research Anti-Plague Institute, 7, Golubinsky Str., Volgograd, Russian Federation, 400131.

*The objective of the review – the analysis of results of researches on the characteristics of strains of bacilli from the *B. cereus sensu lato* group, causing anthrax-like diseases of the people and some animal species. The facts testify that along with the evolution of *Bacillus anthracis* microbe which has led to acquisition of major factors of virulence – plasmids *pXO1* and *pXO2*, emergence of strains of bacilli with plasmids of virulence similar to *B. anthracis*, but retaining *B. cereus sensu stricto* properties is possible. The reasons and conditions of emergence of such strains aren't established yet.*

Key words: evolution of *B. anthracis*, *B. cereus*, plasmid *pXO1* and *pXO2*

Возбудитель сибирской язвы (антракса) *Bacillus anthracis* привлекает внимание огромного количества исследователей во многих странах мира. Одна из причин этого – ведущая роль сибиреязвенного микроба как потенциального агента биотерроризма [1, 2].

Заболевания сибирской язвой в США в 2001 г., связанные с отправленными по почте конвертами, заполненными сухим порошком спор вирулентного штамма *B. anthracis Ames*, явились причиной смерти 5 из 11 человек с ингаляционной формой сибирской язвы [1]. Эти события еще более усилили интерес к изучению вопросов диагностики, лечения, профилактики сибирской язвы, а также характеристике факторов вирулентности *B. anthracis*.

B. anthracis – единственный облигатный патоген человека и травоядных млекопитающих в группе близкородственных бацилл, именуемой *B. cereus sensu lato* (в широком смысле) [3, 4]. Кроме того,

в эту группу входят *B. cereus sensu stricto* (в узком смысле): *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* и *B. weihenstephanensis*. *B. cereus* – почвенный сапрофит, однако отдельные его штаммы вызывают пищевые отравления с симптомами рвоты и диареи [5–8]. Многие штаммы *B. thuringiensis* содержат параспоральные кристаллические белки, токсичные для насекомых и некоторых видов беспозвоночных [9, 10]. *B. mycoides* и *B. pseudomycoides* – непатогенные сапрофиты, образующие колонии у корней растений [11]. Штаммы *B. weihenstephanensis*, обитающие в почве, физиологически приспособлены к низким температурам окружающей среды [12].

По мнению некоторых ученых, все виды бацилл, входящие в группу *B. cereus s.l.*, по существу представляют один вид в связи с незначительными генетическими отличиями по данным анализа полиморфизма 16S – 23 S рРНК генах [13], *multilocus sequence typing* (MLST) – мультилокусного сиквенс-типирования [14] и высокой степени общности состава генов [15]. Молекулярно-генетические исследования подтвердили данные о том, что виды, входящие в группу *B. cereus*, составляют три клада [14, 16, 17]. Первый включает все изученные штаммы *B. anthracis* и часть штаммов *B. cereus*. Осталь-

Для корреспонденции: Липницкий Анатолий Васильевич, доктор мед. наук, проф., гл. науч. сотр. лаб. сибирской язвы ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский институт Роспотребнадзора, e-mail: lipnitskii@list.ru

ные штаммы *B. cereus* и большинство штаммов *B. thuringiensis* включены во второй клад. Клад 3-й составляют штаммы *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* и *B. weihenstephanensis*. Они обозначены как кластеры С, Т и W [18].

Didelot и соавт. [19] попытались реконструировать эволюционную историю штаммов группы *B. cereus*. С помощью MLST было исследовано 667 штаммов бацилл, вызывающих различные заболевания. 155 штаммов, патогенных для человека, разделены на 6 групп: 31 штамм – *B. anthracis*; 29 штаммов, вызывали эндокардит, нейтропению и лихорадку; 22 – диарею; 15 – другие поражения желудочно-кишечного тракта с симптомами тошноты и рвоты; 14 – пневмонию и другие поражения легких; 44 – раневые инфекции, включая штаммы, выделенные при ожогах, укусах насекомых и послеоперационных осложнениях.

Авторы подтвердили существование трех основных кладов в группе *B. cereus*, принадлежность *B. anthracis* к первому кладу и распределение штаммов *B. cereus* между первым и вторым кладами. При этом, хотя авторы и сделали заключение о существовании некоторых барьеров в обмене генетической информации («генного потока») между кладами, однако не выявлено отличий в характеристике рекомбинационных процессов между патогенными и сапрофитическими штаммами *B. cereus s.l.*

Классическая схема исторической эволюции возбудителя сибирской язвы, обусловившая его вирулентность для людей и большинства травоядных млекопитающих, включает два этапа [3]. На первом этапе произошло отделение в группу *B. cereus* ряда близкородственных видов бацилл от огромного большинства бацилл, обитающих в почве, на втором – отделение *B. anthracis* от остальных членов группы *B. cereus* путем приобретения детерминант основных факторов вирулентности – плазмид рХО1 и рХО2, кодирующих соответственно трехкомпонентный токсин и капсулообразование, а также некоторых хромосомных мутаций [20]. Как известно, основной «образ жизни» сибирезявленного микроба определяется длительным существованием в окружающей среде в виде покоящихся спор и альтернативным коротким периодом пребывания в организме млекопитающих проросших из спор вегетативных клеток, репликация которых при инфицировании составляет 20–40 генераций [20, 21]. Таков средний период нахождения в организме *B. anthracis* от момента инфицирования до гибели или выздоровления. После этого сибирезявленный микроб вновь возвращается в состояние «покоя». Из этого следует, что генетическая эволюция *B. anthracis* ограничена короткими периодами существования микроорганизма в вегетативной форме. Как полагают, в связи с этим *B. anthracis* эволюционирует очень медленно по сравнению с большинством других видов бактерий с подобными периодами генераций, и поэтому он генетически и фенотипически высоко гомогенен [15, 22].

На основе canonical Single nucleotide polymorphism (canSNP) – канонических единичных полиморфизмов и Multiple Loci Variable Number of Tandem Repeats Analysis (MLVA) – мультилокусного анализа количества варибельных тандемных повторов Pilo, Frey [20] показали возможность создания молекулярно-эпидемиологической модели для определения возраста диверсификации в эволюции *B. anthracis* и глобального распределения этого патогена. Последнее было в основном связано с мировым движением домашнего рогатого скота вместе с переселенцами, международной торговлей загрязненными возбудителем сибирской язвы продуктами животноводства.

Несмотря на очевидные достижения в расшифровке эволюционного развития *B. anthracis*, участвовавшие в последнее десятилетие проявления «антраксоподобных» заболеваний людей и животных, вызванные вирулентными штаммами *B. cereus s. s.* (в некоторых случаях и *B. thuringiensis* [23, 24], а не «классическими» штаммами *B. anthracis*, поставили вопрос о закономерностях и причинах этого явления, а также определили необходимость детального молекулярно-генетического изучения подобных штаммов.

В 1994 г. в штате Луизиана, США от сварщика, заболевшего тяжелой пневмонией, был выделен штамм *B. cereus* G9241. В октябре и ноябре 2003 г. с разницей в три недели в двух разных местах штата Техас были описаны два смертельных случая заболевания рабочих, связанных с обработкой металла, напоминающие клинически ингаляционную форму сибирской язвы. В первом случае из культуры крови был выделен штамм *B. cereus* 03BB102, а из образцов с рабочего места – *B. cereus* 03BB108. Во втором случае из крови был изолирован штамм *B. cereus* 03BB87. Прежде всего следует отметить, что никакой эпидемиологической связи между случаями заболеваний в Техасе и случаем в Луизиане не выявлено. Тем не менее один из штаммов, выделенных в Техасе (03BB87), был почти неотличим от штамма *B. cereus* G9241, изолированного в 1994 г. в Луизиане. Единственное различие было связано со степенью экспрессии генов капсулы. Штаммы *B. cereus*, выделенные в Техасе, исследовались с помощью Amplified fragment length polymorphism (AFLP) (анализ полиморфизма длин амплификационных фрагментов) и MLST, который был основан на секвенировании семи «housekeeping» генов (glpF, gmk, ilvD, pta, pur, rucA, tpi). Штаммы *B. cereus* 03BB102 и 03BB108 были похожи, но отличались друг от друга по генетическому профилю плазмиды рХО1, а также по морфологии колоний. *B. cereus* 03BB108 не происходит от *B. cereus* 03BB102 в результате простой потери плазмидной ДНК. Дальнейшее сравнение *B. cereus* 03BB102 и 03BB108 с другими штаммами *B. anthracis*, *B. cereus* и *B. thuringiensis* показало, что, они филогенетически более схожи с *B. anthracis*, чем с *B. cereus* 03BB87 и G9241. Они также тесно

связаны с двумя другими патогенными *Bacillus* (*B. thuringiensis* 97-27 и *B. cereus* E33L) и двумя токсигенными изолятами *B. cereus* (D17 и 3а). Штаммы *B. cereus* 03BB87 и G9241 отнесены к сиквенс-типу 78, *B. cereus* 03BB102 и 03BB108 – 11, все штаммы – к кладу 1 [25–27].

Oh и соавт. [28] при секвенировании штамма *B. cereus* G9241 также выявили две плазмиды вирулентности, близкие к рХО1 и рХО2. Плазида рВСХО1 кодировала *pagA1*-гомолог протективного антигена *B. anthracis* и *hasACB*, обеспечивающий образование капсулы из гиалуроновой кислоты. Плазида рВС218 контролировала *brpx-n* – экзополисахарид *B. cereus*, формирующий вторую капсулу. При антраксоподобном заболевании, вызванном штаммом *B. cereus* G9241, происходило образование обеих капсул, которые вместе, по-видимому, играли существенную роль в патогенезе заболевания людей. Однако, по данным Wilson и соавт. [29], штамм *B. cereus* G9241 был авирулентным для кроликов после подкожного заражения и в 100 раз менее вирулентным, чем референтный штамм *B. anthracis* Ames, после аэрозольного заражения. Для мышей нескольких линий LD₅₀ этого штамма была значительно выше, чем для *B. anthracis* Ames, и близка к таковой токсигенного бескапсульного вакцинного штамма *B. anthracis* Sterne.

В 2001–2002 гг. от 6 шимпанзе и горилл в Западной Африке (Камерун) и от 6 диких шимпанзе, скоропостижно умерших в национальном парке Тан в Кот-д’Ивуар с симптомами сибирской язвы, также выделены штаммы *B. cereus*, содержащие обе плазмиды вирулентности *B. anthracis* рХО1 и рХО2 [30–32]. В последующем они подверглись детальному молекулярно-генетическому исследованию. Было проведено полное секвенирование генома одного из этих штаммов, изолированного от шимпанзе «Лео» (CI) [33]. В отличие от классических штаммов *B. anthracis*, штамм CI оказался подвижным, у него отсутствовали 4 профага и не выявлялась нонсенс-мутация. Были идентифицированы четыре репликаона – хромосома и три плазмиды. Сравнительный геномный анализ показал, что его хромосома напоминает таковую других видов группы *B. cereus*, но не *B. anthracis*, тогда как две плазмиды были идентичны плазмидам вирулентности *B. anthracis* рХО1 и рХО2. Функция впервые обнаруженной третьей плазмиды с длиной 14 т.п.н. пока остается неизвестной. Сравнение геномных локусов, кодирующих ключевые функции, подтвердила более тесную близость этого штамма со штаммом *B. thuringiensis* 97-27, серовар *konkukian* и *B. cereus* E33L, чем со штаммами *B. anthracis*. Эти два штамма были выбраны для сравнительного анализа в связи с тем, что они проявляют вирулентность и по данным MLST [14, 16, 34] тесно связаны с *B. anthracis*: штамм *B. thuringiensis* 97-27 был изолирован от человека с тяжелым некрозом ткани, а *B. cereus* E33L – от зебры, предположительно умершей от сибирской язвы, хотя этот диагноз

в последующем не подтвержден. Авторы впервые показали, что штамм CI, вызывающий заболевание, напоминающее сибирскую язву, не принадлежит по генетической структуре к монофильной группе штаммов *B. anthracis*. Они предположили, что он эволюционировал из штамма *B. cereus* независимо от классических штаммов *B. anthracis*, сохранив черты *B. cereus*, но приобрел новый «образ жизни», характерный для возбудителя сибирской язвы. Поэтому было предложено именовать этот штамм как «*B. cereus* variety (var) *anthracis*».

Однако открытие «странных» сибиреязвенных штаммов продолжалось. Оказалось, что они являются причиной вспышек смертельной болезни и выделяются не только от обезьян, но и от крупного рогатого скота, в частности в Камеруне. Pilo и соавт. [35], анализируя один из таких штаммов (JF3964), указали на то, что филогенетически он проявляет себя как *B. cereus* – резистентен к специфическому для *B. anthracis* γ -фагу и пенициллину. В то же время в отличие от *B. cereus* он не проявлял гемолитическую активность. Хромосомные маркеры, используемые как диагностические при идентификации сибиреязвенного микроба – *sap* и *Ba* 813 у этого штамма отсутствовали. Однако он содержал гены вирулентности, обусловленные плазмидами *B. anthracis* рХО1 и рХО2. Наличие обеих плазмид было подтверждено их экстракцией из штамма вместе с выделением их из типичного штамма *B. anthracis* Vollum. В упомянутой работе генетическая характеристика штаммов, выделенных в Камеруне во время вспышек сибирской язвы среди крупного рогатого скота, проводилась с помощью *canSNP*, который признан эволюционно стабильным и наилучшим для оценки филогенетических взаимоотношений *B. anthracis*, а также MLVA – самого точного метода субтипирования штаммов сибиреязвенного микроба. Авторы показали, что штаммы *B. anthracis*, изолированные от крупного рогатого скота в Западной и Центральной Африке, принадлежат к филогенетической группе A β , которая ранее не выявлялась вне этой зоны. Более того, они сделали заключение, что в этом регионе присутствует субтип *B. anthracis*, принадлежащий к новому кладу (D), имеющий тесное родство с *B. cereus* и вызывающий симптомы антракса у крупного рогатого скота, как и у приматов Западной и Центральной Африки.

Несмотря на наличие ограниченного количества штаммов из группы *B. cereus*, вызывающих антраксоподобные заболевания человека и животных, появление новых штаммов с подобными свойствами кажется вполне реальным. В частности, известно, что плазмиды рХО1, рХО2 или со сходной генетической структурой обнаружены и у других видов рода *Bacillus* – отдаленных родственников сибиреязвенного микроба. Так, капсульный оперон плазмиды рХО2 *B. anthracis* был выявлен в составе крупных плазмид у двух первично не идентифицированных штаммов бацилл, выделенных из внешней среды.

Один из них в дальнейшем был идентифицирован как *B. circulans*, второй – не принадлежит ни к одному из известных видов бацилл, но более тесно связан с *B. luciferensis* [36].

Таким образом, впервые крупные плазмиды с генами вирулентности *B. anthracis* идентифицированы у видов бацилл, не входящих в группу *B. cereus*. Однако по данным рестрикционного анализа плазмиды *B. circulans* (CBD118) отличалась от «классической» плазмиды рХО2. Плазмида, обнаруженная в другом штамме (CBD119), также имела сходство с рХО2. Тем не менее у обоих штаммов, несмотря на наличие плазмиды, экспрессия капсулы не происходила [36].

Учитывая приведенные факты, связанные с появлением вирулентных для человека и животных штаммов бацилл с фенотипом, отличным по ряду признаков от «классических» штаммов *B. anthracis*, возникает вопрос об эволюционном происхождении таких штаммов. Существует обоснованное мнение, что сибиреязвенный микроб имеет крайне ограниченные естественные возможности обмена генетическим материалом (в том числе плазмидами вирулентности) с другими бациллами, даже с родственными видами группы *B. cereus* [37]. Как уже указывалось, это обусловлено тем, что основная (споровая) форма *B. anthracis* десятилетиями может находиться в почве в покоящемся состоянии и неспособна к рекомбинационным процессам. Правда, существует мнение, подкрепленное некоторыми экспериментами, что штаммы *B. anthracis* могут прорасти в ризосфере определенных травянистых растений из спор в длинные цепи вегетативных клеток, в которых возможен обмен плазмидами [38]. Сообщается о возможности прорастания *B. anthracis*, лишённого плазмиды рХО2, в обогащенной автоклавированной почве [20]. Однако, на наш взгляд, проведенные экспериментальные исследования пока недостаточны для суждения о реальной возможности генетического обмена между *B. anthracis* и другими бациллами в окружающей среде. Следовательно, горизонтальный перенос генов плазмид вирулентности рХО1 и рХО2, возможен в ограниченный период инфекционного заболевания, который, по-видимому, не приводит к какому-либо генетическим вариациям даже внутри вида [39, 40]. Ведь наиболее отличающиеся между собой штаммы *B. anthracis* имеют более 99,99% идентичности нуклеотидной последовательности [40] и внутривидовая дифференциация сибиреязвенного микроба возможна лишь с помощью SNP и VNTR [41].

Мы не имеем экспериментальных данных, подтверждающих, что такой естественный генетический обмен плазмидами вирулентности между *B. anthracis* и другими бациллами может происходить в организме человека и животных. Тем не менее в лабораторных условиях осуществление переноса плазмид между штаммами внутри группы *B. cereus*

не представляет серьезных трудностей, поскольку имеются многочисленные гены мобильности и гены с конъюгативной функцией на плазмиде рХО2 [33, 42]. Плазмиды *B. anthracis* не самотрансмиссибельны, но как рХО1, так и рХО2 могут быть перенесены от *B. anthracis* к излеченным от плазмид штаммам *B. anthracis* или реципиентным штаммам *B. cereus* с помощью мобилизующих плазмид. Необходимым условием для горизонтального переноса генов является прямой (конъюгация) или не прямой (трансформация, трансдукция) контакты вегетативных клеток штаммов донора и реципиента. Предполагается, что конъюгация – наиболее реальный путь переноса плазмид в группе *B. cereus* [43].

Итак, эволюция вирулентных штаммов бацилл, прежде всего из группы *B. cereus*, вызывающих «антраксоподобные» заболевания, пока не ясна. С одной стороны, вирулентный потенциал членов этой группы, генетически весьма близких к *B. anthracis*, очень высок и полностью обусловлен «шансом» получения токсиносодержащей и капсульной плазмид путем горизонтального переноса генов. Патогены такого типа названы «многообещающими монстрами (hopeful monsters)» [44]. В прошлом, хотя и относительно недавно в историческом смысле, т.е. 20–30 тыс. лет назад [45] *B. anthracis*, будучи «многообещающим монстром» осуществил такую возможность и распространился по всему миру. Высокая варибельность внутри группы *B. cereus* по наличию крупных плазмид, свидетельствует об интенсивном обмене информацией путем горизонтального переноса генов [46, 47]. По данным Нап и соавт. [48], *B. cereus* и *B. thuringiensis* имеют полные наборы генов, необходимых для кодирования трехкомпонентного токсина и капсулы из полиглутаминовой кислоты. С другой стороны, отсутствие рекомбинаций в эволюционной истории сибиреязвенного микроба, низкие уровни его генетической варибельности связаны именно с ограниченными возможностями дивергенции его вегетативной формы в природе [22].

По-видимому, лишь дальнейшие эпидемиологические и молекулярно-биологические исследования, особенно важные в связи с обнаружением наиболее отличных от *B. anthracis* вирулентных штаммов *B. cereus*, преимущественно африканского происхождения, помогут установить место, время и обстоятельства, приведшие к появлению таких штаммов.

С учетом своеобразия природных условий Западной Африки, следует обратить особое внимание на возможности сохранения и размножения вегетативной формы сибиреязвенного микроба в окружающей среде. Тем не менее нельзя исключить, что подобные штаммы могли быть генетически сконструированы в лабораторных условиях.

Независимо от причин появления таких штаммов, следует отметить, что микробиологические методы диагностики сибирской язвы, основанные на множестве общепринятых признаков идентификации *B. anthracis*, таких как отсутствие подвижности

и гемолиза, чувствительность к специфическому γ -фагу и пенициллину (тест «жемчужного ожерелья») и других, с подобными штаммами могут дать ложноотрицательные результаты. По-видимому, неоднозначные результаты могут быть получены и при оценке их вирулентности на лабораторных животных. В этих условиях наиболее надежными кажутся молекулярно-генетические методы, основанные на обнаружении двух плазмид вирулентности (pXO1 и pXO2). В то же время необходимо помнить о бесплазмидных штаммах и штаммах с элиминацией одной из плазмид *B. anthracis*, которые иногда выделяются из окружающей среды [1].

Таким образом, при эпидемиологическом расследовании и лабораторной диагностике инфекционных заболеваний с клиническими симптомами сибирской язвы необходимо учитывать возможность обнаружения необычных штаммов *B. anthracis* или других бацилл. Адекватный диагноз, в этом случае, возможен лишь при исследовании принципов полифазной таксономии, т. е. комплексного подхода, включающего наряду с бактериологией и серологией генодиагностику и генотипирование.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сибирская язва: актуальные проблемы разработки и внедрения медицинских средств защиты: Руководство для врачей / Онищенко Г. Г., Кожухов В. В., Васильев Н. Т., Бондарев В. П., Борисевич И. В., Дармов И. В. и др.; под ред. Г. Г. Онищенко и др. М.: Медицина; 2010.
2. Inglesby T., O'Toole T., Henderson D., Bartlett J., Ascher M., Eitzen E. et al. Anthrax as a biological weapon, 2002: updated recommendations for management. J.A.M.A. 2002; 287(17): 2236–52.
3. Yu G.X. Pathogenic *Bacillus anthracis* in the progressive gene losses and gains in adaptive evolution. BMC Bioinform. 2009; 10 (Suppl. 1): S3.
4. Turnbull P. Introduction: anthrax history, disease and ecology. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2002; 271: 1–19.
5. Ehling-Schulz M., Fricker M., Scherer S. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. Mol. Nutr. Food Res. 2004; 48: 479–87.
6. Ehling-Schulz M., Svensson B., Guinebretiere M.-H., Lindback T., Andersson M., Schulz A. et al. Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. Microbiology. 2005; 151: 183–97.
7. Ehling-Schulz M., Fricker M., Grallert H., Rieck P., Wagner M., Scherer S. Cereulide synthetase gene cluster from emetic *Bacillus cereus*: Structure and location on a mega virulence plasmid related to *Bacillus anthracis* toxin plasmid pXO1. BMC Microbiol. 2006; 6: 20.
8. Stenfors Arnesen L., Fagerlund A., Granum P. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. FEMS Microbiol. Rev. 2008; 32: 579–606.
9. Berry C., O'Neil S., Ben-Dov E., Jones A., Murphy L., Quail M. et al. Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis. Appl. Environ. Microbiol. 2002; 68(10): 5082–95.
10. Roh J., Choi J., Li M., Jin B., Je Y. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. J. Microbiol. Biotechnol. 2007; 17(4): 547–59.
11. Nakamura L., Jackson M. Clarification of the taxonomy of *Bacillus mycoides*. Int. J. Syst. Bacteriol. 1995; 45: 46–9.
12. Lechner S., Mayr R., Francis K., Priess B., Kaplan T., Wiessner-Gunkel E. et al. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. Int. J. Syst. Bacteriol. 1998; 4: 1373–82.
13. Daffonchio D., Cherif A., Brusetti L., Rizzi A., Mora D., Boudabous A., Borin S. Nature of polymorphisms in 16S-23S rRNA gene intergenic transcribed spacers fingerprinting of *Bacillus* and related genera. Appl. Environ. Microbiol. 2003; 69: 5128–37.
14. Priest F., Barker M., Baillie L., Holmes E., Maiden M. Population structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. J. Bacteriol. 2004; 186: 7959–70.
15. Rasko D., Worsham P., Abshire T., Stanley S., Bannan J., Wilson M. et al. Microbial forensic applications of comparative genome analysis: Identification of *Bacillus anthracis* genetic markers in the Amerithrax investigation. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2011; 108(12): 5027–32.
16. Helgason E., Økstad O., Caugant D., Johansen H., Fouet A., Mock M. et al. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* – one species on the basis of genetic evidence. Appl. Environ. Microbiol. 2000; 66: 2627–30.
17. Ko K., Kim J.W., Kim J.M., Kim W., Chung S., Kim I.J., Kook Y.H. Population structure of the *Bacillus cereus* group as determined by sequence analysis of six housekeeping genes and the plcR Gene. Infect. and Immunity. 2004; 72: 5253–61.
18. Sorokin A., Candelon B., Guilloux K., Galleron N., Wackerow-Kouzova N., Ehrlich S.D. et al. Multiple-locus sequence typing analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* reveals separate clustering and a distinct population structure of psychrotrophic strains. Appl. Environ. Microbiol. 2006; 72(2): 1569–78.
19. Didelot X., Barker M., Falush D., Priest F. Evolution of pathogenicity in the *Bacillus cereus* group. Syst. Appl. Microbiol. 2009; 32(2): 81–90.
20. Pilo P., Frey J. *Bacillus anthracis*: Molecular taxonomy, population genetics, phylogeny and patho-evolution (Review) Infect., Genet. Evol. 2011; 11: 1218–24.
21. Keim P., Gruendike J., Klevytska A., Schupp J., Challacombe J., Okinaka R. The genome and variation of *Bacillus anthracis*. Mol. Aspects Med. 2009; 30: 397–405.
22. Zwick M., Joseph S., Didelot X., Chen P., Bishop-Lilly K., Stewart A. et al. Genomic characterization of the *Bacillus cereus* sensu lato species: backdrop to the evolution of *Bacillus anthracis*. Genome Res. 2012; 22(8): 1512–24.
23. Hernandez E., Ramisse F., Ducoureaux J., Cruel T., Cavallo J. *Bacillus thuringiensis* subsp. konkukian (serotype H34) superinfection: case report and experimental evidence of pathogenicity in immunosuppressed mice. J. Clin. Microbiol. 1998; 36(7): 2138–9.
24. Challacombe J.F., Altherr M.R., Xie G., Bhotika S.S., Brown N., Bruce D. et al. The complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* Al Hakam. J. Bacteriol. 2007; 189: 3680–1.
25. Hoffmaster A., Ravel J., Rasko D., Chapman G., Chute M., Marston C. et al. Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2004; 101(22): 8449–54.
26. Hoffmaster A., Hill K., Gee J., Marston C., De B., Popovic T. et al. Characterization of *Bacillus cereus* isolates associated with fatal pneumonias: strains are closely related to *Bacillus anthracis* and harbor *B. anthracis* virulence genes. J. Clin. Microbiol. 2006; 44(9): 3352–60.
27. Hoffmaster A., Novak R., Marston C., Gee J., Helsel L., Pruckler J., Wilkins P. Genetic diversity of clinical isolates of *Bacillus cereus* using multilocus sequence typing. BMC Microbiol. 2008; 8: 191.
28. Oh S.Y., Budzik J. M., Garufi G., Schneewind O. Two capsular polysaccharides enable *Bacillus cereus* G9241 to cause anthrax-like disease. Mol. Microbiol. 2011; 80: 455–70.
29. Wilson M., Vergis J., Alem F., Palmer J., Keane-Myers A., Brahmabhatt T. et al. *Bacillus cereus* G9241 makes anthrax toxin and capsule like highly virulent *B. anthracis* Ames but behaves like attenuated toxigenic nonencapsulated *B. anthracis* Sterne in rabbits and mice. Infect. and Immunity. 2011; 79(8): 3012–9.
30. Leendertz F., Ellerbrok H., Boesch C., Couacy-Hymann E., Mätz-Rensing K., Hakenbeck V. et al. Anthrax kills wild chimpanzees in a tropical rainforest. Nature. 2004; 430: 451–2.
31. Leendertz F., Lankester F., Guislain P., Néel C., Drori O., Dupain

- J. et al. Anthrax in western and Central African great apes. *Am. J. Primatol.* 2006; 68 (9): 928–33.
32. Leendertz F., Yumlu S., Pauli G., Boesch C., Couacy-Hymann E., Vigilant L. et al. A new *Bacillus anthracis* found in wild chimpanzees and a gorilla from West and Central Africa. *PLoS Pathog.* 2006; 2(1): e8.
 33. Klee S., Brzuszkiewicz E., Nattermann H., Bruggemann H., Dupke S., Wollherr A. 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: e10986.
 34. Klee S., Ozel M., Appel B., Boesch C., Ellerbrok H. et al. Characterization of *Bacillus anthracis*-like bacteria isolated from wild great apes from Cote d'Ivoire and Cameroon. *J. Bacteriol.* 2006; 188: 5333–44.
 35. Pilo P., Rossano A., Bamanga H., Abdoukadi S., Perreten V., Frey J. Bovine *Bacillus anthracis* in Cameroon. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011; 77(16): 5818–21.
 36. Luna V., King D., Peak K., Reeves F., Heberlein-Larson L., Veiguilla W. *Bacillus anthracis* virulent plasmid pXO2 genes found in large plasmids of two other *Bacillus* species. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(7): 2367–77.
 37. Zwick M., Thomason M., Chen P., Johnson H., Sozhamannan S., Mateczun A., Read T. Genetic variation and linkage disequilibrium in *Bacillus anthracis*. *Scien. Rep.* 2011; 1: 169.
 38. Saile E., Koehler T. *Bacillus anthracis* multiplication, persistence, and genetic exchange in the rhizosphere of grass plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72: 3168–74.
 39. Keim P., Price L., Klevytska A., Smith K., Schupp J., Okinaka R. et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* 2000; 182: 2928–36.
 40. Van Ert M., Easterday W., Huynh L., Okinaka R., Hugh-Jones M., Ravel J. et al. Global genetic population structure of *Bacillus anthracis*. *PLoS One.* 2007; 2: e461.
 41. Van Ert M., Easterday W., Simonson T., U'Ren J., Pearson T., Kenefic L. et al. Strain-specific single-nucleotide polymorphism assays for the *Bacillus anthracis* Ames strain. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45: 47–53.
 42. Hu X., Van der A., Timmerly S., Zhu L., Mahillon J. Distribution, diversity, and potential mobility of extrachromosomal elements related to the *Bacillus anthracis* pXO1 and pXO2 virulence plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75: 3016–28.
 43. Van der Auwera G., Andrup L., Mahillon J. Conjugative plasmid pAW63 brings new insights into the genesis of the *Bacillus anthracis* virulence plasmid pXO2 and of the *Bacillus thuringiensis* plasmid pBT9727. *BMC Genom.* 2005; 6: 103.
 44. Keim P., Wagner D. Humans and evolutionary and ecological forces shaped the phylogeography of recently emerged diseases. *Nature. Rev. Microbiol.* 2009; 7: 813–21.
 45. Ivanova N., Sorokin A., Anderson I., Galleron N., Candelon B., Kapratral V. et al. Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature.* 2003; 423: 87–91.
 46. Jensen G., Hansen B., Ellenberg J., Mahillon J. The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environ. Microbiol.* 2003; 5: 631–40.
 47. Kolsto A., Tourasse N., Økstad O. What sets *Bacillus anthracis* apart from other *Bacillus* species? *Annu. Rev. Microbiol.* 2009; 63: 451–76.
 48. Han C., Xie G., Challacombe J., Altherr M., Bhotika S., Brown N. et al. Pathogenomic sequence analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolates closely related to *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* 2006; 188: 3382–90.
 - Eitzen E. et al. Anthrax as a biological weapon, 2002: updated recommendations for management. *J.A.M.A.* 2002; 287(17): 2236–52.
 3. Yu G.X. Pathogenic *Bacillus anthracis* in the progressive gene losses and gains in adaptive evolution. *BMC Bioinform.* 2009; 10 (Suppl. 1): S3.
 4. Turnbull P. Introduction: anthrax history, disease and ecology. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2002; 271: 1–19.
 5. Ehling-Schulz M., Fricker M., Scherer S. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. *Mol. Nutr. Food Res.* 2004; 48: 479–87.
 6. Ehling-Schulz M., Svensson B., Guinebretiere M.-H., Lindback T., Andersson M., Schulz A. et al. Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. *Microbiology.* 2005; 151: 183–97.
 7. Ehling-Schulz M., Fricker M., Grallert H., Rieck P., Wagner M., Scherer S. Cereulide synthetase gene cluster from emetic *Bacillus cereus*: Structure and location on a mega virulence plasmid related to *Bacillus anthracis* toxin plasmid pXO1. *BMC Microbiol.* 2006; 6: 20.
 8. Stenfors Arnesen L., Fagerlund A., Granum P. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Rev.* 2008; 32: 579–606.
 9. Berry C., O'Neil S., Ben-Dov E., Jones A., Murphy L., Quail M. et al. Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002; 68(10): 5082–95.
 10. Roh J., Choi J., Li M., Jin B., Je Y. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2007; 17(4): 547–59.
 11. Nakamura L., Jackson M. Clarification of the taxonomy of *Bacillus mycoides*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1995; 45: 46–9.
 12. Lechner S., Mayr R., Francis K., Prüss B., Kaplan T., Wiessner-Gunkel E. et al. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1998; 4: 1373–82.
 13. Daffonchio D., Cherif A., Brusetti L., Rizzi A., Mora D., Boudabous A., Borin S. Nature of polymorphisms in 16S-23S rRNA gene intergenic transcribed spacers fingerprinting of *Bacillus* and related genera. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 69: 5128–37.
 14. Priest F., Barker M., Baillie L., Holmes E., Maiden M. Population structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. *J. Bacteriol.* 2004; 186: 7959–70.
 15. Rasko D., Worsham P., Abshire T., Stanley S., Bannan J., Wilson M. et al. Microbial forensic applications of comparative genome analysis: Identification of *Bacillus anthracis* genetic markers in the Amerithrax investigation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2011; 108(12): 5027–32.
 16. Helgason E., Økstad O., Caugant D., Johansen H., Fouet A., Mock M. et al. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* – one species on the basis of genetic evidence. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000; 66: 2627–30.
 17. Ko K., Kim J.W., Kim J.M., Kim W., Chung S., Kim I.J., Kook Y.H. Population structure of the *Bacillus cereus* group as determined by sequence analysis of six housekeeping genes and the *plcR* Gene. *Infect. and Immun.* 2004; 72: 5253–61.
 18. Sorokin A., Candelon B., Guilloux K., Galleron N., Wackerow-Kouzova N., Ehrlich et al. Multiple-locus sequence typing analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* reveals separate clustering and a distinct population structure of psychrotrophic strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72: 1569–78.
 19. Didelot X., Barker M., Falush D., Priest F. Evolution of pathogenicity in the *Bacillus cereus* group. *Syst. Appl. Microbiol.* 2009; 32(2): 81–90.
 20. Pilo P., Frey J. *Bacillus anthracis*: Molecular taxonomy, population genetics, phylogeny and patho-evolution (Review) *Infect., Genet. Evol.* 2011; 11: 1218–24.
 21. Keim P., Gruendike J., Klevytska A., Schupp J., Challacombe J., Okinaka R. The genome and variation of *Bacillus anthracis*. *Mol. Aspects Med.* 2009, 30: 397–405.
 22. Zwick M., Joseph S., Didelot X., Chen P., Bishop-Lilly K., Stewart A. et al. Genomic characterization of the *Bacillus cereus* sensu

REFERENCES

1. Anthrax: the actual problems of development and introduction of prophylaxis means into medical practice. Onishchenko G.G., Kozuhov V.V., Vasilyev N.T., Bondarev V.P., Borisevich I.V. Darmov I.V. etc. / G.G. Onishchenko, etc. Moscow: Medicine; 2010. (in Russian).
2. Inglesby T., O'Toole T., Henderson D., Bartlett J., Ascher M.,

- lato species: backdrop to the evolution of *Bacillus anthracis*. *Genome Res.* 2012; 22(8): 1512–24.
23. Hernandez E., Ramisse F., Ducoureau J., Cruel T., Cavallo J. *Bacillus thuringiensis* subsp. *konkukian* (serotype H34) superinfection: case report and experimental evidence of pathogenicity in immunosuppressed mice. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36(7): 2138–9.
 24. Challacombe J.F., Altherr M.R., Xie G., Bhotika S.S., Brown N., Bruce D. et al. The complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* Al Hakam. *J. Bacteriol.* 2007; 189: 3680–1.
 25. Hoffmaster A., Ravel J., Rasko D., Chapman G., Chute M., Marston C. et al. Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2004; 101(22): 8449–54.
 26. Hoffmaster A., Hill K., Gee J., Marston C., De B., Popovic T. et al. Characterization of *Bacillus cereus* isolates associated with fatal pneumonias: strains are closely related to *Bacillus anthracis* and harbor *B. anthracis* virulence genes. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(9): 3352–60.
 27. Hoffmaster A., Novak R., Marston C., Gee J., Helsel L., Pruckler J., Wilkins P. Genetic diversity of clinical isolates of *Bacillus cereus* using multilocus sequence typing. *BMC Microbiol.* 2008; 8: 191.
 28. Oh S.Y., Budzik J. M., Garufi G., Schneewind O. Two capsular polysaccharides enable *Bacillus cereus* G9241 to cause anthrax-like disease. *Mol. Microbiol.* 2011; 80: 455–70.
 29. Wilson M., Vergis J., Alem F., Palmer J., Keane-Myers A., Brahmhatt T. et al. *Bacillus cereus* G9241 makes anthrax toxin and capsule like highly virulent *B. anthracis* Ames but behaves like attenuated toxigenic nonencapsulated *B. anthracis* Sterne in rabbits and mice. *Infect. and Immun.* 2011; 79(8): 3012–9.
 30. Leendertz F., Ellerbrok H., Boesch C., Couacy-Hymann E., Mätz-Rensing K., Hakenbeck V. et al. Anthrax kills wild chimpanzees in a tropical rainforest. *Nature.* 2004; 430: 451–2.
 31. Leendertz F., Lankester F., Guislain P., Néel C., Drori O., Dupain J. et al. Anthrax in western and Central African great apes. *Am. J. Primatol.* 2006; 68 (9): 928–33.
 32. Leendertz F., Yumlu S., Pauli G., Boesch C., Couacy-Hymann E., Vigilant L. et al. A new *Bacillus anthracis* found in wild chimpanzees and a gorilla from West and Central Africa. *PLoS Pathog.* 2006; 2(1): e8.
 33. Klee S., Brzuszkiewicz E., Nattermann H., Bruggemann H., Dupke S., Wollherr A. 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: e10986.
 34. Klee S., Ozel M., Appel B., Boesch C., Ellerbrok H. et al. Characterization of *Bacillus anthracis*-like bacteria isolated from wild great apes from Cote d'Ivoire and Cameroon. *J. Bacteriol.* 2006; 188: 5333–44.
 35. Pilo P., Rossano A., Bamanga H., Abdoukadi S., Perreten V., Frey J. Bovine *Bacillus anthracis* in Cameroon. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011; 77(16): 5818–21.
 36. Luna V., King D., Peak K., Reeves F., Heberlein-Larson L., Ve-guilla W. *Bacillus anthracis* virulent plasmid pXO2 genes found in large plasmids of two other *Bacillus* species. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(7): 2367–77.
 37. Zwick M., Thomason M., Chen P., Johnson H., Sozhamannan S., Mateczun A., Read T. Genetic variation and linkage disequilibrium in *Bacillus anthracis*. *Scien. Rep.* 2011; 1: 169.
 38. Saile E., Koehler T. *Bacillus anthracis* multiplication, persistence, and genetic exchange in the rhizosphere of grass plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72: 3168–74.
 39. Keim P., Price L., Klevytska A., Smith K., Schupp J., Okinaka R. et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* 2000; 182: 2928–36.
 40. Van Ert M., Easterday W., Huynh L., Okinaka R., Hugh-Jones M., Ravel J. et al. Global genetic population structure of *Bacillus anthracis*. *PLoS One.* 2007; 2: e461.
 41. Van Ert M., Easterday W., Simonson T., U'Ren J., Pearson T., Kenefic L. et al. Strain-specific single-nucleotide polymorphism assays for the *Bacillus anthracis* Ames strain. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45: 47–53.
 42. Hu X., Van der A., Timmerly S., Zhu L., Mahillon J. Distribution, diversity, and potential mobility of extrachromosomal elements related to the *Bacillus anthracis* pXO1 and pXO2 virulence plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75: 3016–28.
 43. Van der Auwera G., Andrup L., Mahillon J. Conjugative plasmid pAW63 brings new insights into the genesis of the *Bacillus anthracis* virulence plasmid pXO2 and of the *Bacillus thuringiensis* plasmid pBT9727. *BMC Genom.* 2005; 6: 103.
 44. Keim P., Wagner D. Humans and evolutionary and ecological forces shaped the phylogeography of recently emerged diseases. *Nature. Rev. Microbiol.* 2009; 7: 813–21.
 45. Ivanova N., Sorokin A., Anderson I., Galleron N., Candelon B., Kapratral V. et al. Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature.* 2003; 423: 87–91.
 46. Jensen G., Hansen B., Ellenberg J., Mahillon J. The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environ. Microbiol.* 2003; 5: 631–40.
 47. Kolstø A., Tourasse N., Økstad O. What sets *Bacillus anthracis* apart from other *Bacillus* species? *Annu. Rev. Microbiol.* 2009; 63: 451–76.
 48. Han C., Xie G., Challacombe J., Altherr M., Bhotika S., Brown N. et al. Pathogenomic sequence analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolates closely related to *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* 2006; 188: 3382–90.

Поступила 25.07.13