

საქართველოში გამოყოფილი ჯილების შტამების მოლეკულური ტიპირება
და ფილოგენეტიკური ანალიზი

ეკატერინე ხმალაძე

საზოგადოებრივი ჯანდაცვის დოქტორის აკადემიური ხარისხის
მოსაპოვებლად წარმოდგენილი დისერტაცია

სამეცნიერო ხელმძღვანელი შოთა ცანავა
მედიცინის აკადემიური დოქტორი, ასოცირებული პროფესორი
ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტის მედიცინის
ფაკულტეტის საზოგადოებრივი ჯანდაცვის დეპარტამენტი

ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი
მედიცინის ფაკულტეტი

თბილისი, 2018

სარჩევი

1	შესავალი	6
1.1	პრობლემის აქტუალობა.....	6
1.2	კვლევის მიზანი და ამოცანები	7
1.3	ნაშრომის მეცნიერული სიახლე.....	7
1.4	ნაშრომის პრაქტიკული ღირებულება	8
2	ლიტერატურული მიმოხილვა	8
2.1	ჯილეხის ისტორია.....	8
2.2	ჯილეხის ეტიოლოგია	10
2.3	ჯილეხის კლინიკური ფორმები და პათოგენეზი	11
2.4	ჯილეხის ეპიდემიოლოგია.....	15
2.5	ჯილეხის გავრცელება მსოფლიოში.....	17
2.6	ჯილეხის გავრცელება საქართველოში	20
2.7	ჯილეხის კონტროლი და პროფილაქტიკა.....	25
2.7.1	ჯილეხის კონტროლი	25
2.7.2	ვაქცინაცია.....	25
2.8	ჯილეხის ლაბორატორიული დიაგნოსტიკა	29
2.9	ჯილეხის მკურნალობა	30
2.10	ჯილეხის მოლეკულური ტიპირება და გლობალური ფილოგენეტიკა	31
3	კვლევის მასალა და მეთოდები.....	38
3.1	შტამების ბაქტერიოლოგიური მომზადება	38
3.2	დნმ-ის ექსტრაქცია.....	39
3.3	პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია (პჯრ) რეალურ დროში – real-time PCR	40
3.4	ერთ-ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმი (Single Nucleotide Polymorphism -SNP).....	41
3.4.1	სრული გენომის სექვენირება Aust94 ჯგუფის შესწავლის მიზნით	42
3.4.2	ქართული შტამებისთვის სპეციფიკური CanSNP სელექცია და ანალიზი.....	42
3.5	მრავლობითი ლოკუსების ტანდემურად განმეორებადი თანმიმდევრობების ცვლადი რაოდენობის ანალიზი – MLVA	46
3.6	სრული გენომის სექვენირება (Whole Genome Sequencing - WGS)	52
3.6.1	გენომური დნმ - ის ექსტრაქცია.....	52
3.6.2	დნმ ბიბლიოთეკის მომზადება, სექვენირება და მონაცემთა ანალიზი	54
4	კვლევის შედეგები.....	58

4.1	<i>B. anthracis</i> დადასტურება.....	58
4.2	<i>B. anthracis</i> SNP გენოტიპირება	58
4.3	<i>B. anthracis</i> MLVA გენოტიპირება	66
4.4	<i>B. anthracis</i> სრული გენომის სექვენირება - WGS.....	69
5	დისკუსია	74
6	ნაშრომის ინგლისურენოვანი რეზიუმე	81
7	დანართები.....	87
7.1	დანართი 1 - კვლევაში გამოყენებული დკსჯეც-ის კოლექციაში არსებული <i>B. anthracis</i> შტამების სრული აღწერა	87
7.2	დანართი 2 - საერთაშორისო ჟურნალებში გამოქვეყნებული სტატიები	93
7.3	დანართი 3 - საერთაშორისო კონფერენციებზე წარდგენილი მოხსენებები	94
8	გამოყენებული ლიტერატურა.....	Error! Bookmark not defined.

ილუსტრაციების ჩამონათვალი

სურათი 1. <i>B. anthracis</i> სასიცოცხლო ციკლი.....	16
სურათი 2. ადამიანებში ჯილხის ინციდენტობა, 2008-2017 წწ.....	23
სურათი 3. ადამიანებში ჯილხის შემთხვევების რაოდენობა, 2008-2017 წწ.....	23
სურათი 4. ადამიანებში ჯილხის შემთხვევების გადანაწილება რეგიონების მიხედვით, 2009-2017 წწ.....	24
სურათი 5. ადამიანებში ჯილხის შემთხვევათა განაწილება ინფიცირების რისკის ფაქტორების მიხედვით, 2008-2017 წ.წ.	24
სურათი 6. MLVA-8 გენოტიპირების შედეგად მიღებული ფილოგენეტიკური ხე; A და B კლასტერებში გაერთიანებული 89 უნიკალური გენოტიპი	33
სურათი 7. canSNP ტიპირების შედეგებზე დაყრდნობით აგებული <i>B. anthracis</i> გლობალური ფილოგენეტიკური ხე	36
სურათი 8. დენდროგრამა ასახავს მსოფლიოში გავრცელებლი 1,033 <i>B. anthracis</i> შტამის MLVA-15 და SNP ტიპირების შედეგად მიღებულ გენოტიპებს.....	37
სურათი 9. <i>B. anthracis</i> დამადასტურებელი real-time PCR ამპლიფიკაციის მრუდები.....	41
სურათი 10. ა. ლლობის მრუდი; ბ. ლლობის პიკი (BioRad CFX96 Real-Time Detection System).....	44
სურათი 11. სხვადასხვა SNP ალელების (Der & Anc) განსხვავებული ზომების გელით ვიზუალიზაცია	45
სურათი 12. MLVA-25 პრაიმერების დიზაინი და ფლუორესცენტული საღებავებით მონიშვნის სქემა. ისრებით ნაჩვენებია VNTR-ის ზომის დიაპაზონი. ისრის ფერი მიუთითებს ფლუორესცენტული საღებავის ფერს რომლითაც მონიშნულია VNTR (მწვანე = VIC TM ; ლურჯი = FAM; შავი= NED TM ; წითელი=PET TM)......	48
სურათი 13. <i>B. anthracis</i> MLVA-25 ელექტროფეროგრამების GeneMapper-ით ვიზუალიზაცია	50
სურათი 14. დაჭრილი დნმ ფრაგმენტების პიკების ზომების ვიზუალიზაცია და სელექცია.....	54
სურათი 15. MAFFT პროგრამაში „Clustal“ ფორმატით შტამებს შორის ურთიერთ განლაგება: (ა) SNR ლოკუსი CL10 (ბ) SNR ლოკუსი CL12	57
სურათი 16. MLST – 7 მოურავი გენის აღწერა; სექვენს ტიპის (ST) განსაზღვრა. Sequence Comparator პროგრამა;	57
სურათი 17. In Silico გენოტიპირების მეთოდი - MLVABank 5.0	58
სურათი 18. კანონიკური SNP-ჯგუფები.....	59
სურათი 19. <i>B. anthracis</i> ქართული შტამები განთავსდა A.Br.013 კანონიკურ ქვეჯგუფში.....	59

სურათი 20. <i>B. anthracis</i> ფილოგენეტიკა საქართველოში. A) სექვენირებული რეფერენს და ქართული იზოლატები განთავსებული მთლიანი გენომის სექვენირების ფილოგენეტიკურ ხეზე. ტერმინალური ქვეჯგუფების წარმომადგენელი სექვენირებული შტამები მონიშნულია ვარსკვლავებით. B) Aust94 და კანონიკური SNP ჯგუფების გადანაწილება ქართულ განშტოებაში. C) 272 ქართული <i>B. anthracis</i> იზოლატის ფილოგეოგრაფია დატანილია ქვეყნის რუქაზე რაიონების მიხედვით.....	62
სურათი 21. <i>B. anthracis</i> ქართული და თურქული შტამების SNP დენდროგრამა	65
სურათი 22. <i>B. anthracis</i> ქართული შტამების MLVA-25 დენდროგრამა	67
სურათი 23. <i>B. anthracis</i> თურქული შტამების MLVA-25 დენდროგრამა	68
სურათი 24. <i>B. anthracis</i> 13 ქართული გენომი განთავსებული გლობალურ ფილოგენეტიკურ ხეზე.....	70
სურათი 25. SNR-კვლევის შედეგად აგებული დენდროგრამა.....	72
სურათი 26. 10 <i>B. anthracis</i> იზოლატზე MLVA8 / MLVA 15 და MLVA25 / MLVA 31 კვლევების მიხედვით აგებული დენდროგრამა (BioNumerics v. 7.6 პროგრამა).....	73
სურათი 27. A.Br.013/015 ჯგუფის Aust94 და 52-G განშტოებები	75

ცხრილების ჩამონათვალი

ცხრილი 1. Melt-MAMA და გელ-ელექტროფორეზით ანალიზისათვის შერჩეული კანონიკური SNP პრაიმერები	46
ცხრილი 2. MLVA-25 კვლევაში გამოყენებული პრაიმერების ჩამონათვალი	47
ცხრილი 3. MLVA-25 PCR სარეაქციო ნარევის მომზადების ცხრილი (ნარევი A, B, C და D).....	49
ცხრილი 4. <i>B. anthracis</i> MLVA-25 VNTR-ების მოსალოდნელი ზომები	51
ცხრილი 5. სექვენირებული <i>B. anthracis</i> შტამები	52
ცხრილი 6. კვლევაში გამოყენებული <i>B. anthracis</i> რეფერენს შტამები.	60
ცხრილი 7. <i>B. anthracis</i> ქართული და თურქული შტამების გადანაწილება SNP ჯგუფებში	64
ცხრილი 8. <i>B. anthracis</i> შტამების სექვენირებისა და აწრობის შემდეგ მიღებული მაჩვენებლები.71	
ცხრილი 9. <i>pagA</i> გენის ანალიზის შედეგები.....	72

1 შესავალი

1.1 პრობლემის აქტუალობა

საქართველოში, ისევე როგორც მთელ მსოფლიოში ჯილხის წინააღმდეგ ბრძოლა საზოგადოებრივი ჯანმრთელობის / ეპიდზედამხედველობის ერთ-ერთ პრიორიტეტად მიიჩნევა; მაღალი ვირულენტობის და სიკვდილის გამოწვევის შესაძლებლობის გამო, აგრეთვე, გარემოში სპორების წარმოქმნის და ნიადაგში მრავალი ათეული წლის განმავლობაში სიცოცხლისუნარიანობის შენარჩუნების თვისებების გათვალისწინებით *Bacillus anthracis* განსაკუთრებით საშიშ პათოგენთა 1-ლი რისკ-ჯგუფის ბიოლოგიური საფრთხის პათოგენს მიეკუთვნება.

ჯილხის ენდემურ ზონებში პირუტყვის მაღალმა სიკვდილიანობამ შესაძლოა გამოიწვიოს ადგილობრივი სოფლის მეურნეობის სექტორის შესუსტება და გარკვეულწილად ამით მოსახლეობისთვის საარსებო წყაროს დარღვევაც. საზოგადოებრივი ჯანდაცვის ისეთი საფრთხეების, როგორც მაგალითად ჯილხია, პრევენციის, გამოვლენის და მათზე რეაგირების გაძლიერება სულ უფრო მნიშვნელოვანი ხდება ენდემური ქვეყნებისათვის, რათა მათ შეძლონ 2005 წლის ჯანმრთელობის საერთაშორისო წესების (IHR) და ჯანმრთელობის გლობალური უსაფრთხოების დღის წესრიგის (GHSA) მოთხოვნების დაკმაყოფილება.

ჯილხი საქართველოში ენდემურ დაავადებად ითვლება. ადამიანთა და ცხოველთა დაავადების შემთხვევები გვხვდება ქვეყნის ყველა რეგიონში გავრცელების სხვადასხვა ინსტენსივობით; უკანასკნელი 2-3 წლის განმავლობაში ქვეყანაში ადამიანთა დაავადების კლების ტენდენცია აღინიშნება, რაც დაკავშირებულია ცხოველებში ჯილხის საწინააღმდეგო ვაქცინაციის სისტემის ამოქმედებასთან. მიუხედავად ამისა, დღემდე, ბოლომდე მოგვარებულად ვერ ჩაითვლება დაავადებულ ცხოველთა დაკვლის / დამუშავების წესების და მათი სამარხების მოწყობის დაცვის საქმე, რაც თავის მხრივ კვლავ რჩება ადამიანებში ჯილხის განვითარების მაღალი რისკის მატარებელ ფაქტორად.

ლ. საყვარელიძის სახელობის საქართველოს დაავადებათა კონტროლისა და საზოგადოებრივი ჯანმრთელობის ეროვნული ცენტრი (დკსჯეც) ქვეყანაში

განსაკუთრებით საშიშ ინფექციებზე ეპიდზედამხედველობის პროგრამის ფარგლებში მუდმივად აწარმოებს ჯილხის ბუნებრივი კერების შერჩევითი და დაავადების კლინიკური გავრცელების სრულ მონიტორინგს.

1.2 კვლევის მიზანი და ამოცანები

დღესდღეობით დესჯეც კოლექციაში *B. anthracis* 580 შტამი ინახება, რომელთა თანამედროვე მოლეკულური მეთოდების (ერთ-ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმი - SNP, მრავლობითი ლოკუსების ტანდემურად განმეორებადი თანმიმდევრობების ცვლადი რაოდენობის ანალიზი - MLVA და ახალი თაობის სრული გენომის სექვენირება - WGS გამოყენებით ჯილხის გამომწვევის გენოტიპირება და ფილოგენეტიკური ანალიზი მოცემული სადისერტაციო ნაშრომის ძირითად მიზანს წარმოადგენდა. დასახული მიზნის განსახორციელებლად შემდეგი ამოცანების რეალიზება გახდა საჭირო:

- *B. anthracis* შტამების გენოტიპირებისათვის თანამედროვე მოლეკულური მეთოდების რუტინულ პრაქტიკაში დანერგვა
- მოლეკულური მეთოდებით საქართველოში მოცირკულირე *B. anthracis* შტამების გენეტიკური მრავალფეროვნების შესწავლა
- ჯილხის შტამების პასპორტიზაცია
- საერთო მონაცემთა ბაზის შექმნა

1.3 ნაშრომის მეცნიერული სიახლე

- პირველად საქართველოში შესწავლილ იქნა ქვეყანაში გავრცელებული ჯილხის შტამების გენეტიკური ტიპები და მათი თავისებურებები
- აღმოჩენილი იქნა ქართული *B. anthracis* იზოლატებისთვის სპეციფიკური რვა ახალი გენეტიკური SNP ქვეჯგუფი
- გენეტიკურ ჯგუფებში დამატებით მრავალფეროვნების შესწავლის შედეგად გამოვლინდა რამდენიმე MLVA და SNR გენეტიკური პროფილი

- დადგინდა საქართველოში მოცირკულირე *B. anthracis* იზოლატების ნათესავური კავშირები მსოფლიოს სხვადასხვა ქვეყნიდან გამოყოფილ ჯილების შტამებთან

1.4 ნაშრომის პრაქტიკული ღირებულება

ნაშრომის ფარგლებში ჩატარებულმა კვლევებმა გარემოსა და ადამიანს შორის პათოგენის ცირკულაციაზე დაკვირვების საშუალება მოგვცა; ამავდროულად, ზემოთ აღწერილი მეთოდების პრაქტიკაში დანერგვამ შესაძლებელი გახადა როგორც ახლად იზოლირებული ჯილების შტამების ინფექციის წყაროს დროულად გამოვლენა, ასევე კლინიკური და გარემო ნიმუშების წარმომავლობის და მათი გენეტიკური კავშირების დადგენა.

ყოველივე ზემოთხსენებულის გათვალისწინებით, აღნიშნული ნაშრომის ფარგლებში აღწერილი კვლევები ხელს უწყობს ქვეყანაში მიმდინარე ჯილების ეპიდზედამხედველობის შესაძლებლობების გაძლიერებას და პროგრამის კიდევ უფრო ეფექტურ განხორციელებას. თავის მხრივ ჯილების ეპიდზედამხედველობის გაძლიერება უაღრესად დიდ როლს ასრულებს მოსახელობის ჯილებით ავადობის შემცირებასა და ზოგადი ჯანმრთელობის საკითხების განმტკიცებაში.

2 ლიტერატურული მიმოხილვა

2.1 ჯილების ისტორია

პირველი დაავადება, რომლის გამომწვევი ბაქტერიის, *Bacillus anthracis*-ის, იდენტიფიცირებაც მოხდა, ჯილები იყო (Dutz W, et al, 1981). დაავადების სახელწოდება მიმდინარეობს ბერძნული სიტყვისგან „anthrakis“, რომელიც ნიშნავს ნახშირს, ვინაიდან ჯილების კანის ფორმის შემთხვევაში კანზე ჩნდება ნახშირის მსგავსი, შავი დაზიანებები (Goel, A. K. 2015; Inglesby TV, et al, 1999).

Casimir Davaine და Pierre Rayer იყვნენ პირველნი, ვინც შეამჩნიეს ჩხირის ფორმის მიკროორგანიზმები ჯილებით დაავადებული ცხოველისა და ადამიანის სისხლში 1850

წელს. 1863 წელს Davaine-მა დაამტკიცა, რომ ეს ჩხირები, მეტი ალბათობით, იწვევდნენ ციმბირის წყლულს, ვინაიდან ცხვარს არ განუვითარდა დაავადება ინფიცირებულთან კონტაქტის გარეშე (*Compton, J, et al, 1987*). 1876 წელს რობერტ კოხმა შეიმუშავა მეთოდი *B. anthracis* -ის სუფთა კულტურის მისაღებად. აღნიშნული მეთოდი მას აძლევდა საშუალებას, ყოფილიყო პირველი, ვინც ნათელს მოჰფენდა ჯილეხის ჩხირის სრულ სასიცოცხლო ციკლს - სპორებიდან ვეგეტატიურ ფორმამდე და შემდეგ ისევ სპორებამდე (*Biddle, W. 1995*). კოხმა, ასევე, გამოიყენა *B. anthracis*, რათა შეემუშავებინა და დაემტკიცებინა საკუთარი პოსტულატები დაავადების მიკრობული წარმოშობის თაობაზე (*Koch, R. 1876; Compton, J, et al, 1987*).

1881 წელს ლუი პასტერმა შექმნა ჯილეხის საწინააღმდეგო პირველი მნიშვნელოვანი ვაქცინა ფერმენტისთვის (*Pasteur L, 1881; Goel, A. K. 2015*). მიუხედავად იმისა, რომ 1870-იანი წლების შემდეგ ხელმისაწვდომი იყო ჯილეხის საწინააღმდეგო ვაქცინები, დაავადება კვლავ რჩებოდა საფრთხედ როგორც პირუტყვისთვის, ისე ადამიანებისთვის, განსაკუთრებით რიგ განვითარებად ქვეყნებში, რომლებიც აზიის, აფრიკის და სამხრეთ ამერიკის კონტინენტებზეა განლაგებული (*Dutz W, et al, 1981*). უფრო მეტიც, დადგინდა, რომ *B. anthracis* ერთდროულად მრავალი ქვეყნის, მათ შორის აშშ-ს ბიოლოგიური თავდაცვის არსენალის ნაწილი იყო. 1972 წლის ბიოლოგიური იარაღის კონვენციის თანახმად, ამ იარაღის წარმოება აიკრძალა (*Hilleman, M. 2002*). მიუხედავად ამისა, *B. anthracis* კვლავ მიიჩნევა 17 ქვეყნის ბიოლოგიური თავდაცვის არსენალის ნაწილად (*Inglesby TV, et al, 1999*).

მსოფლიოს დღევანდელი მდგომარეობისა და ტერორიზმის არაპროგნოზირებადი ხასიათის გათვალისწინებით, მაღალეფექტური ვაქცინის დამზადება, რომელიც უზრუნველყოფს დაავადების ყველა ფორმისგან სრულად დაცვას, იქნებოდა ეროვნული ბიოლოგიური თავდაცვის არსენალის მნიშვნელოვანი კომპონენტი (*Cimons, M. 1998; Compton, J, et al, 1987*).

2.2 ჯილეხის ეტიოლოგია

B. anthracis აერობული, გრამ-დადებითი, უძრავი ჩხირებია (Koehler T M, et al, 1994). ბაქტერიის ზომაა 1-1.5მმ x 3-10მმ (Ibrahim KH, et al, 1999). სპორების წარმოქმნა აღინიშნება როგორც ცენტრალურად, ასევე პარაცენტრალურად და არ იწვევს ბაქტერიის დეფორმაციას (Dixon TC, et al, 1999; Inglesby TV, et al, 1999). სპორების ფორმირება ხდება ნუტრიენტების მარაგის ამოწურვისას, მაგალითად, მასპინძლის სიკვდილის შემდეგ ან ჰაერთან ექსპოზიციისას (Barlett JG, et al, 2002). *B. anthracis* სპორები ძლიერ რეზისტენტულია გარემო ფაქტორების მიმართ და ინარჩუნებს სიცოცხლისუნარიანობას ნიადაგში, ჰაერზე, წყალსა და მცენარეებში, მიუხედავად უკიდურესი სიციხის ან სიცივის, გამომშრების, ქიმიური ნივთიერებებით დამუშავებისა თუ ულტრაიისფერ სხივებთან კონტაქტისა. სპორების მაღალი რეზისტენტობა ხელს უწყობს მათ ხანგრძლივ არსებობას გარემოში (Dragon DC, et al, 1995; Dutz W, et al, 1981). ბაქტერია კარგად იზრდება 37°C-ზე ყველა ჩვეულებრივ მიკრობიოლოგიურ ნიადაგზე, ცხვრის სისხლიანი აგარის ჩათვლით, და წარმოქმნის არა-ჰემოლიზურ კოლონიებს. მყარ საკვებ არეზე, როგორც წესი, ვლინდება 4-5მმ უხეში, თეთრი კოლონიები, დამახასიათებელი მძიმის მსგავსი ფორმით, რომელსაც ხშირად მოიხსენიებენ, როგორც „ხვეული თმის“ ან „მედუზის თავისებურ“ კოლონიებს (Ibrahim KH, et al, 1999, Inglesby TV, et al, 1999). *B. anthracis* ქსოვილში განლაგებულია ერთეული ან წყვილების სახით და კულტივირებისას წარმოქმნის კლასიკურ, „ვაგონისებრ“ გრძელ ჯაჭვს (Dutz W, et al, 1981). *B. anthracis* *B. cereus* ჯგუფის წარმომადგენელია, რომელშიც, ასევე, გაერთიანებულია *B. cereus*, *B. thuringiensis* და *B. Mycoides*; ჯილეხის ჩხირის განსხვავება აღნიშნული ჯგუფის სხვა წარმომადგენლებისგან რამდენიმე მეთოდით არის შესაძლებელი. *B. cereus* ჯგუფის ყველა წევრი, გარდა *B. anthracis* -ისა, ხასიათდება პენიცილინის მიმართ რეზისტენტობით ქრომოსომული გენების მიერ კოდირებული ბეტა-ლაქტამაზას გამო (Dixon TC, et al, 1999). მახასიათებლებს, რომლებიც გამოარჩევს *B. anthracis* -ს *Bacillus* სხვა სახეობებისგან, მიეკუთვნება ჰემოლიზის არარსებობა, უძრაობა და D-გლუტამინის მჟავის შემცველი ანტიფაგოციტური კაფსულა (Ibrahim KH, et al, 1999; Mesnage S, et al, 1998).

2.3 ჯილხის კლინიკური ფორმები და პათოგენეზი

დაავადება მანიფესტირდება კანის, ინჰალაციური (ფილტვისმიერი) ან გასტროინტესტინური ფორმით, სპორების ორგანიზმში მოხვედრის გზის მიხედვით. უკანასკნელი ორი - ინჰალაციური და გასტროინტესტინური ფორმა განსაკუთრებით ლეტალური და შედარებით იშვიათია (*Goossens PL, 2009; Banerjee D, et al, 2017*).

- ჯილხის კანის ფორმა, მსოფლიოს მასშტაბით, ჯილხის ყველა შემთხვევის 95%-ში ფიქსირდება და, უმთავრესად, პროფესიული კონტაქტით არის გამოწვეული (*WHO, 4th edition, 2008*) კანის ფორმის შემთხვევაში ყველაზე ხშირად ზიანდება თავი, კისერი და კიდურები. სპორების შეჭრა, როგორც წესი, ხდება კანის ჭრილობის ან ნაკაწრის გზით, ამასთან, კანის ტრავმის არსებობა არ არის აუცილებელი (*Dixon TC, et al, 1999*). ინკუბაციური პერიოდი, სპორების შეჭრის შემდეგ, ჩვეულებრივ, გრძელდება 1-10 დღე. საწყისი სიმპტომები ხშირად ვლინდება ინფექციის კერაში არსებული უმტკივნეულო პაპულის სახით, რომელსაც ახასიათებს ქავილი და მიაგავს მწერის ნაკბენს. 1-2 დღეში ხდება პაპულის ვასკულარიზაცია, ზოგ შემთხვევაში - ჰემორაგიით. ამ ვეზიკულების გახეთქვის შემდეგ წარმოიქმნება წყლულები ფოკალური შემუპებით, რაც განაპირობებს დამახასიათებელი მშრალი, ნეკროზული, შავი ცენტრის ფორმირებას. დაავადება, როგორც წესი, ლოკალიზებულია, თუმცა პაციენტებს შესაძლოა გამოუვლინდეთ ცხელება, სისუსტე და თავის ტკივილი. ანტიბიოტიკოთერაპია ვერ აჩერებს პაპულის წყლულად გარდაქმნის პროცესს. დიფერენციალური დიაგნოზი უნდა გატარდეს ყავისფერი ობობის ნაკბენთან, ცელულიტთან, წლულოვან-ჯირკვლოვან ტულარემიასთან, ყვავილთან (პოქსვირუსებით გამოწვეულ კანის დაზიანებებთან), განგრენოზულ ექტიმასა და კატის ნაკაწრთან (*Barlett JG, et al, 2002*). ანტიბიოტიკოთერაპიის დაწყებამდე რეკომენდებულია ნებისმიერი დაზიანების ლაბორატორიული დიაგნოსტიკა. სიკვდილიანობის მაჩვენებელი ჯილხის კანის ფორმის შემთხვევაში, ანტიბიოტიკოთერაპიის გარეშე, 20%-ს შეადგენს, ანტიბიოტების მკურნალობის ფონზე კი - იშვიათია (*Inglesby TV, et al, 1999*).

- ჯილენის ინჰალაციური ფორმა ვითარდება სპორების ფილტვების ალვეოლურ სივრცეში დეპონირების შედეგად (*Holty JE, et al, 2006*). ისტორიულად, ინჰალაციური ფორმა იმ ადამიანთა იშვიათი პროფესიული დაავადებაა, რომლებიც ნედლ მატყლთან მუშაობენ, აქედან გამომდინარე, მას „მატყლის დამხარისხებელთა დაავადება“ დაარქვეს (*Bell JH, et al, 1880*). ჯილენის სპორებით დაავადების გავრცელება (1979 წელს - სვერდლოვსკის სამხედრო საწარმოდან, ყოფილ სსრკ-ში, 2001 წელს - აშშ-ში) წარმოადგენს ბიოლოგიური იარაღის ყველაზე ხშირად გამოსაყენებელ ფორმას ბიოტერორიზმის შემთხვევებში. ფილტვის ქსოვილში შეღწევისთანავე სპორები შთაინთქმება მაკროფაგების მიერ და ტრანსპორტირდება შუასაყრისა და ჰილუსის ლიმფურ კვანძებში, სადაც ისინი გარდაიქმნება ვეგეტაციურ ფორმად. მომწიფებასთან ერთად, ბაქტერიები იწყებენ გამრავლებას და ტოქსინის პროდუქცია. გერმინაციის შემდეგ დაავადების სიმპტომები სწრაფად იწყებენ გამოვლენას. როგორც წესი, ეს იწყება ინფექციის წყაროსთან ექსპოზიციიდან 1-10 დღეში. ჯილენის ინჰალაციური ფორმა ფულმინანტური დაავადებაა, რომელიც ხშირად 2 ეტაპად მიმდინარეობს. საწყისი სიმპტომები არის არასპეციფიკური, გრიპის ან ატიპური პნევმონიის მსგავსი (*Plotkin SA, et al, 2002; Grinberg LM, et al, 2001*). 1-ლი სტადიის სიმპტომები მოიცავს ცხელებას, შემცივნებას, ჭარბ ოფლიანობას, თავის ტკივილს, არაპროდუქტიულ ხველას, ტკივილს გულმკერდის არეში, გულისრევასა და ლებინებას (*Holty JE, et al, 2006; Holty JE, et al, 2006*). ეს სტადია შესაძლოა გაგრძელდეს რამდენიმე საათიდან რამდენიმე დღემდე და დასრულდეს გამოჯანმრთელებით. მას სწრაფად სდევს თან მე-2 სტადია, რომელიც ხასიათდება დისპნოეთი, ცხელებით, ოფლიანობითა და შოკით (*Albrink WS, et al, 1960*). გულმკერდის რენტგენოგრაფია ხშირად გვიჩვენებს შუასაყრის გაფართოებას, თანმდევი ლიმფადენოპათიით (*Ross JM, et al, 1957*). დაავადებისთვის დამახასიათებელია, როგორც წესი, სისხლის შემცველი პლევრული გამონაჟონი. გულმკერდის კომპიუტერული ტომოგრაფიით (CT) ვლინდება დაავადებისთვის სპეციფიკური, შუასაყრისა და ჰილუსების

გამკვრივებული (ჰემორაგიული) ლიმფური კვანძები, შუასაყრის ედემა და პლევრული გამონაჟონი. დიფერენციული დიაგნოზი უნდა გატარდეს გრიპის ვირუსთან, ტუბერკულოზთან, ტულარემიასთან, სარკოიდოზთან, ჰისტოპლაზმოზთან, ლიმფომასთან, სილიკოზთან, სიმსივნესთან, ანევრიზმასა და ალვეოლურ პროტეინოზთან (*Barlett JG, et al, 2002*). სისხლის ბაქტერიოლოგიური ანალიზი და სტერილური სითხეებიდან გამოყოფილი *B. anthracis*-ის დნმ-ის პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციით ტესტირება (PCR) ჯილეხის ინჰალაციური ფორმის დიაგნოსტიკის მნიშვნელოვანი მეთოდია (*Barlett JG, et al, 2002*). ანტიბიოტიკოთერაპია საჭიროა, თუმცა მისი დაწყება რეკომენდებულია მე-2 სტადიის დადგომამდე, რათა უზრუნველყოთ პაციენტის გადარჩენა. აუცილებლად უნდა აღინიშნოს ჯილეხის მენინგეალური ფორმა, რომელიც ძალიან მაღალი სიკვდილიანობის მაჩვენებლით არის ცნობილი და განიხილება როგორც ჯილეხის ძალიან იშვიათი გამოვლინება; თუმცა, პრიმატებზე აეროზოლირებული სპორებით ჩატარებული კვლევების შედეგებმა, ისევე როგორც სვერდლოვსკის აფეთქების (1979 წ) მსხვერპლთა აუტოფსიის შედეგად მიღებულმა ინფორმაციამ ცასლახად აჩვენა, რომ მენინგიტით გართულება ვლინდება ინჰალაციური გზით დაავადებულ 50% პაციენტებში; თავის სიხშირისა და ლეტალობის გათვალისწინებით, ყველა იმ პაციენტში ვინც დასნებოვნებულია ინჰალაციური გზით უნდა იქნეს გათვალისწინებული ჯილეხის მენინგეალური ფორმა და გართულებები (*Garcia AG, et al, 1999; Gürcan, Ç, et al, 2005*). ჯილეხის ინჰალაციური ფორმით გამოწვეული სიკვდილიანობის მაჩვენებელი მერყეობს 80-99%-ს შორის, თუმცა შესაძლოა იყოს ბევრად ნაკლები, თუ მკურნალობა იწყება მე-2 სტადიამდე (*Inglesby TV, et al, 1999; Brook I, 2002*).

- ჯილეხის გასტროინტესტინური, ყველაზე იშვიათი ფორმის მანიფესტაცია შეიძლება მოხდეს ორი გზით, იმის მიხედვით, თუ საჭმლის მომნელებელი ტრაქტის რომელ სეგმენტში დეპონირდება სპორები. სპორების დაგროვება კუჭ-ნაწლავის ტრაქტის ზედა ნაწილში განაპირობებს ჯილეხის ოროფარინგეალური ფორმის, ხოლო მის ქვედა ნაწილში დეპონირება, თემოს ნაწლავისა და ბრმა

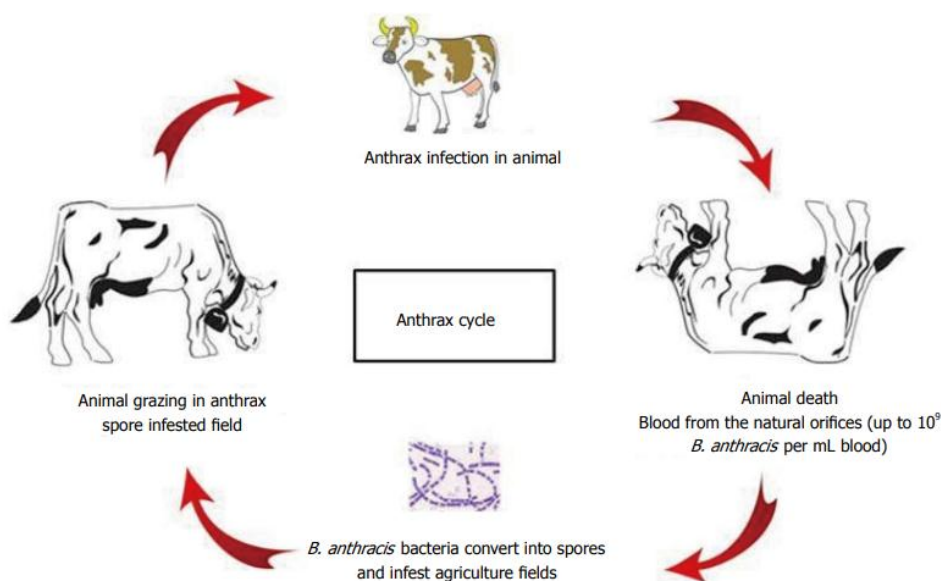
ნაწლავის ჩათვლით - გასტროინტესტინური ფორმის განვითარებას (*Inglesby TV, et al, 1999; Babamahmoodi F, et al, 2006*). აღნიშნული ფორმა, როგორც წესი, გამოწვეულია სპორებით დაბინძურებული ხორცის საკვებად გამოყენებით. ინკუბაციური პერიოდი გრძელდება 2-5 დღე. ინფიცირებული ჯორჯლის მორფოლოგია ავლენს მიკროორგანიზმების არსებობას მუკოზურ და სუბმუკოზურ ლიმფურ ქსოვილში, მეზენტერულ ლიმფადენიტთან ერთად. ჯილეხის გასტროინტესტინური ფორმის დამახასიათებელი სიმპტომია ჯორჯლის დაწყლულება. სხვა ხშირად გამოვლენილ სიმპტომებს მიეკუთვნება რეგიონული ლიმფადენოპათია, ედემა, გულისრევა, ღებინება, სისუსტე, სისხლიანი დიარეა, მწვავე მუცელი, ცხელება, დისფაგია და სეფსისი. ავადობა განპირობებულია სისხლის დანაკარგით, სითხისა და ელექტროლიტების დისბალანსით და შოკით. ლეტალური შედეგი დგება ნაწლავის პერფორაციისა თუ ტოქსემიის გამო. დიაგნოზის დადგენა ხშირად ხდება პერიტონეული სითხის გრამის წესით შეღებვით, რაც ავლენს დიდი ზომის ჩხირებს, ან ასციტური სითხის ბაქტერიოლოგიური გამოკვლევით (*Ibrahim KH, et al, 1999; Dixon TC, et al, 1999*). ჯილეხის გასტროინტესტინური ფორმა ხასიათდება სიკვდილიანობის ძალიან მაღალი მაჩვენებლით, რაც დაკავშირებულია ადრეული დიაგნოსტიკების სირთულესთან. ანტიბიოტიკოთერაპიამ შესაძლოა მოახდინოს სეფსისის განვითარების და სიკვდილის პრევენცია, თუმცა, კანის ფორმის მსგავსად, ის ვერ აჩერებს წყლულების პროგრესირებას (*Inglesby TV, et al, 1999*). *B. anthracis* -ით გამოწვეული ინფექცია იწყება კანში ან ლორწოვან გარსში სპორების შეჭრისას. ამის შემდეგ ხდება სპორების ფაგოციტირება ადგილობრივი მაკროფაგების მიერ და ტრანსპორტირება რეგიონალურ ლიმფურ კვანძებში, რომლებიც ახდენენ შეჭრის ადგილის დრენაჟს. *B. anthracis* ექსტრაცელულური პათოგენია, რომელმაც ინფექციის ინიცირებისთვის ინტრაცელულური სტადია უნდა გაიაროს (*Mock M, et al, 2001*). ის სპორები, რომლებიც გადაურჩებიან ფაგოციტოზს, გერმინაციას განიცდიან თავად მაკროფაგებში. სპორების გერმინაციის სპეციფიკური გამშვები მექანიზმი უცნობია, თუმცა, ზოგადად, გერმინაცია იწყება ამინომჟავებით, ნუკლეოზიდებითა და გლუკოზით მდიდარ

გარემოში შესვლისას, რაც გვხვდება ცხოველისა და ადამიანის მასპინძელ ორგანიზმებში (Dixon TC, et al, 1999; Inglesby TV, et al, 1999).

B. anthracis -ის ვირულენტური ფორმები შეიცავს ორ დიდ, პათოგენობასთან დაკავშირებულ პლაზმიდას: pXO1-ს (181.6 kb) - აკოდირებს ჯილეხის ტოქსინების გენებს: *pagA*, *lef* და *cya* (Koehler TM, 2002; Guidi-Rontani C, et al, 1999) და pXO2-ს (93.5 kb), რომელიც შედიან კაფსულის სინთეზსა და დეგრადაციაზე პასუხისმგებელ გენები: *capA*, *-B*, *-C*, და *-D* (Green BD, et al, 1985; Uchida I, et al, 1985) *B. anthracis* პათოგენურ აქტივობას ავლენს ძირითადად კაფსულისა (ანტი-ფაგოციტური აქტივობა) და იმ ტოქსინების კომპლექსის პროდუქციის მეშვეობით, რომელიც მოიცავს სამ პროტეინს: დამცავს ანტიგენს (PA), ლეტალურ ფაქტორს (LF) და შემუშების ფაქტორს (EF). *B. anthracis* -ის სრული პათოგენურობის გამოსავლენად აუცილებელია აღნიშნული ორი დიდი პლაზმიდა, რომელთაგან ერთ-ერთის ელიმინაცია განაპირობებს მიკროორგანიზმის რადიკალურ ატენუირებას (Fasanella A, et al, 2013).

2.4 ჯილეხის ეპიდემიოლოგია

ჯილეხი ზოონოზური დაავადებაა, რომელიც ძირითადად აზიანებს ბალახისმჭამელ ცხოველებს, როგორებიცაა მსხვილფეხა რქოსანი პირუტყვი - ძროხა, აგრეთვე ცხვარი, თხა, ანტილოპა და ირემი. ისინი ინფიცირდებიან კონტამინირებული მცენარეების, წყლისა და ნიადაგის მოხმარებისას. ჯილეხის ეპიზოოტიები ხშირად სეზონურ ხასიათს ატარებს; ცხოველთა დაავადების უმეტესი შემთხვევები მათ ღია საძოვრებზე გასვლას ემთხვევა (სურათი 1).



სურათი 1. *B. anthracis* სასიცოცხლო ციკლი

ადამიანი, როგორც წესი, შემთხვევით მასპინძელს წარმოადგენს. ჯილეხი განსაკუთრებით ხშირია ცენტრალური და სამხრეთ ამერიკის, სუბსაჰარული აფრიკის, ცენტრალური და სამხრეთ-დასავლეთ აზიის, სამხრეთ და აღმოსავლეთ ევროპის სასოფლო-სამეურნეო რეგიონებში. მიუხედავად იმისა, რომ აშშ-სა და კანადაში თითქმის ყოველწლიურად აღინიშნება ჯილეხის აფეთქებები შინაურ თუ გარეულ ბალახისმჭამელ ცხოველებში, ადამიანის ინფიცირების შემთხვევები ორივე ქვეყანაში იშვიათია. მსოფლიო მასშტაბით, ადამიანებში ყველაზე ხშირად (95-99%) ჯილეხის კანის ფორმა ვლინდება. ჯილეხის კანისა და ნაწლავური ფორმების აფეთქებები ასოცირებულია ინფიცირებული ცხოველების დაკვლას, დამუშავებასა და მათი ხორცის საკვებად გამოყენებასთან. ამ აფეთქებათა უმრავლესობა აღინიშნება აზიისა და აფრიკის ენდემურ კერებში (CDC, 2018).

დაფიქსირებულია მოგზაურობასთან ასოცირებული ჯილეხის მხოლოდ ერთი შემთხვევა. 2006 წელს შეტყობინებულ იქნა ჯილეხის კანის ფორმის კლინიკური შემთხვევა ქალში, რომელიც ტურისტთა მცირე ჯგუფთან ერთად გაემგზავრა ნამიბიასა და ბოტსვანაში, სამხრეთ აფრიკაში. მას არ ჰქონია უშუალო კონტაქტი ცხოველებთან, თუმცა ჯგუფის სხვა წევრი, რომელმაც დაამუშავა 1 (ან მეტი) ცხოველის ლეში,

დაეხმარა მას თითზე არსებული ჭრილობის გაწმენდაში, რაც შემდგომში გარდაიქმნა ჯილეხის დაზიანების კერად. სხვა შემთხვევები აღინიშნა ენდემური ქვეყნებიდან იმპორტირებული, ინფიცირებული თხის ტყავით დამზადებულ დოლებზე დაკვრისა და მათი დამუშავებისას. მიუხედავად იმისა, რომ მსგავსი დოლებით ჯილეხის გამოწვევის რისკი დაბალია, შესაძლებელი რჩება სიცოცხლისთვის საშიში ან ფატალური დაავადების განვითარება: ადამიანებს შორის, რომლებიც ამუშავებდნენ, უკრავდნენ ან უბრალოდ იყვნენ იმ ადგილზე, სადაც აღინიშნებოდა ჯილეხის კანის (4), ნაწლავური (1) და ინჰალაციური (ფილტვისმიერი) (3) ფორმების შემთხვევები (CDC, 2018).

ჩრდილოეთ ევროპაში გამოვლინდა რბილი ქსოვილების მწვავე ინფექციები, სეფსისისა და სისტემური ინფექციის ჩათვლით, წამალდამოკიდებულ ადამიანებში, რაც, სავარაუდოდ, უკავშირდებოდა *B. anthracis* სპორებით დაბინძურებული ჰერონის მოხმარებას. პირებში, რომლებიც არ იღებდნენ ჰერონის, არ გამოვლენილა ჯილეხთან ასოცირებული შემთხვევები და დღემდე, არ დადასტურებულა ჰერონის *B. anthracis* სპორებით დაბინძურების არც ერთი შემთხვევა (Hanczaruk, M, et al, 2014)

ინჰალაციური კონტაქტი, ისტორიულად, დაკავშირებულია ტყავისა და მატყლის ინდუსტრიულ დამუშავებასთან („მატყლის დამხარისხებელთა დაავადება“), თუმცა, უკანასკნელ ათასწლეულებში ის, ასევე, ასოცირებული იყო ბიოტერორიზმთან. ჯილეხის სპორადული შემთხვევები გამოვლინდა აშშ-სა და სხვა არეებში, სადაც ინფექციის წყარო კვლავ დაუდგენელი რჩება.

2.5 ჯილეხის გავრცელება მსოფლიოში

ჯილეხის წარმოშობა, სავარაუდოდ, ეგვიპტესა და მესოპოტამიას უკავშირდება. მრავალი მეცნიერის აზრით, მოსეს ეპოქაში, ეგვიპტის 10 სასჯელიდან მეხუთე - დაავადება, რომელიც ვლინდებოდა ცხენებში, რქოსან პირუტყვში, ცხვრებში, ხარებსა და აქლემებში, სწორედ ჯილეხი უნდა ყოფილიყო. ციმბირის წყლული, ასევე, კარგად ნაცნობი იყო ძველ საბერძნეთსა და რომში, რაც ილუსტრირებულია ამ პერიოდის

ცნობილ მეცნიერთა მრავალ უძველეს ნაწერში. მაგალითად, ბევრი მკვლევარის აზრით, ჯილეხი ასახული იყო ჰომეროსის „ილიადაში“, რომელიც ქრისტეს შობამდე 700 წლით ადრე დაიწერა, ისევე, როგორც ვერგილიუსის პოემებში (*Dirckx JH, 1981*), რომელიც ცხოვრობდა ქრისტეს შობამდე 70-19 წლებში. ზოგიერთის აზრით, ჯილეხმა გარკვეული წვლილი შეიტანა რომის დაცემაში.

სავარაუდოდ, ჯილეხი წარმოიშვა შუა აღმოსავლეთში და გავრცელდა ცხოველებითა და ცხოველური პროდუქტებით ვაჭრობის გზით. ის ვლინდება თითქმის მთელი მსოფლიოს მასშტაბით. მიუხედავად იმისა, რომ ზოგიერთ ქვეყანაში ჯილეხის შემთხვევები არ ფიქსირდება, ის კვლავ ხშირი რჩება ტროპიკულ აფრიკაში, შუა აღმოსავლეთში, ყოფილი საბჭოთა კავშირის მეზობელ ქვეყნებში, ცენტრალური, სამხრეთ ამერიკისა და აზიის გარკვეულ ნაწილებში (*Hugh-Jones M, et al, 2009; Shadomy SV, et al, 2016*). ჯილეხისთვის განსაკუთრებით დამახასიათებელი კერები ცენტრალური და სამხრეთ ამერიკის, სუბსაჰარული აფრიკის, ცენტრალური და სამხრეთ-დასავლეთ აზიის, სამხრეთ და აღმოსავლეთ ევროპისა და კარიბის კუნძულების სასოფლო-სამეურნეო რეგიონებში მდებარეობს.

ჯილეხი იშვიათია ამერიკის შეერთებულ შტატებში, თუმცა სპორადული შემთხვევები მაინც ვლინდება გარეულ და შინაურ ბალახისმჭამელ ცხოველებში, მაგალითად მსხვილფეხა რქოსან პირუტყვებსა და ირმებში. ჯილეხი უფრო ხშირია განვითარებად და იმ ქვეყნებში, რომელთაც არ აქვთ ვეტერინარული ჯანდაცვის პროგრამები ჯილეხის საწინააღმდეგო ვაქცინით ცხოველების რუტინული იმუნიზაციისთვის (*CDC, 2018*)

ჯილეხის ბოლო დროის ეპიდეოლოგიები:

(https://en.wikipedia.org/wiki/List_of_anthrax_outbreaks#See_also)

- 2001 წლის სექტემბერში ჯილეხის სპორების შემცველი წერილები გაიგზავნა რამდენიმე საინფორმაციო მედიის ოფისსა და აშშ-ს ორ სენატორთან, რის შედეგადაც გარდაიცვალა ხუთი და დაინფიცირდა 17 ადამიანი. მათგან 11-ს განუვითარდა ჯილეხის კანის, 11-ს კი ინჰალაციური ფორმა. 22

ინფიცირებულიდან 20 მუშაობდა ადგილზე, სადაც მოხდა ინფიცირებული წერილის მიღება (*Jernigan DB, et al, 2002*).

- 2009 წლის დეკემბერში, ნიუ ჰამპშირში, ქალს დაუდასტურდა ჯილეხის ნაწლავური ფორმა. ის, სავარაუდოდ, დაინფიცირდა დღესასწაულზე, სადაც უკრავდნენ დოლებზე, რამდენიმე დღით ადრე მის ავად გახდომამდე (*CDC, weekly report, 2010*). დოლის ზედაპირიდან აღებული ნიმუშები დადებითი იყო *Bacillus anthracis* არსებობაზე; პაციენტი გადარჩა.
- ბოლო დროს აღწერილი ჯილეხის აფეთქების ბუნებრივი შემთხვევები გამოვლინდა წამალდამოკიდებულ პაციენტებში, 2009 წლის დეკემბრიდან 2010 წლის დეკემბრამდე პერიოდში, ევროპაში, ძირითადად - გაერთიანებულ სამეფოში (*Hicks, C. W, et al, 2012*). საერთო ჯამში, დადასტურებულ შემთხვევათა რაოდენობა 54 იყო, სიკვდილიანობის კი - 18 (*Sweeney DA, et al, 2011*). პაციენტები უჩიოდნენ რბილი ქსოვილების ინფექციას ჰერონის ინექციის არეებში. არსებობს აღნიშნული ჰერონის კონტამინირების რამდენიმე პოტენციური წყარო. ევროპაში გაყიდვადი ჰერონის ძირითადი ნაწილი იწარმოება ავღანეთში და ტრანსპორტირდება ირანისა და თურქეთის გავლით, ჯილეხი კი ენზოოტურია თითოეულ ამ ქვეყანაში (*CIA, 2012, Del Giudice P, 2004*). უფრო მეტიც, ჰერონი, როგორც წესი, ზავდება ნივთიერებებით, რომლებიც ხშირად კონტამინირებულია პათოგენებით (*Powell AG, et al, 2011*).
- 2014 წლის ოქტომბერში ინდოეთის ერთ-ერთ სოფელში ჯილეხის აფეთქების შედეგად დაიღუპა 7 ადამიანი. ინდოეთის დაავადებათა კონტროლის ეროვნული ცენტრის მონაცემებით, ეს იყო ერთ-ერთი ყველაზე დიდი აფეთქება სიკვდილიანობის მაჩვენებლის მიხედვით (*Daniel D, 2014*).
- 2016 წლის ივლისში ჯილეხის აფეთქების შედეგად დაიღუპა დაახლოებით 40 ადამიანი მომთაბარე ტომებიდან ჩრდილოეთ ციმბრში, რუსეთში და 1,500-ზე მეტი ჩრდილოეთის ირემი - იამალო-ნენეცის ავტონომიურ რაიონში. ამავე აფეთქებას შეეწირა 12 წლის ბავშვი (*Anthrax outbreak triggered by climate change kills boy in Arctic Circle". The Guardian*). მეცნიერების აზრით, დნობის შედეგად

მიწის საფარიდან გამოთავისუფლდა ჩრდილოეთის ირმის ლეში, რომელიც დაილუპა ჯილეხის წინა აფეთქებისას, 1968 წელს (*Tess Owen, 2016*).

- აუცილებლად უნდა აღინიშნოს ჯილეხის აფეთქება სვერდლოვსკში - 1979 წლის აპრილსა და მაისში საბჭოთა კავშირში, ქალაქ სვერდლოვსკში დაფიქსირდა ჯილეხის უჩვეულო აფეთქება (*Meselson M et al, 1994; Abramova F, et al, 1993*). მიუხედავად ამისა, აღნიშნული აფეთქების შესახებ შეტყობინება არ გაკეთებულა დასავლურ მედიაში 1980-იანი წლების დასაწყისამდე. მოგვიანებით, ამავე წელს, საბჭოთა სამედიცინო, ვეტერინარულ და იურიდიულ ჟურნალებში გამოქვეყნებული სტატიები ამ შემთხვევას აღწერდა, როგორც ფერმებისთვის დამახასიათებელ, ბუნებრივ აფეთქებას, რომელმაც გამოიწვია 96 კლინიკური შემთხვევა ადამიანებში. მათგან 79 იყო ჯილეხის ნაწლავური, 17 კი - კანის ფორმა. საბჭოთა მოხელეების ინფორმაციით 96 ინფიცირებული ადამიანიდან 64 გარდაიცვალა ჯილეხის ნაწლავური ფორმით.

ინდუსტრიული ჰიგიენის გაუმჯობესებამ, იმპორტირებული კონტამინირებული ცხოველური წარმოშობის მასალების გამოყენების შემცირებამ და რისკის ქვეშ მყოფი მომუშავე პერსონალის იმუნიზაციამ, შესაბამისად, განაპირობა ჯილეხის ინციდენტობის შემცირება, განსაკუთრებით განვითარებულ ქვეყნებში (*Brachman PS, 1980*) თუმცა იშვიათი შემთხვევები კვლავ ვლინდება.

2.6 ჯილეხის გავრცელება საქართველოში

საქართველოში ჯილეხი ოდითგანვე ცნობილია. სხვადასხვა კუთხეში მას სხვადასხვა სახელით მოიხსენიებდნენ - „ციმბირის წყლული“ „ჯილეხი“, „თვალა“, „მუწუკი“, „ხუზარა“, „ბედნიერი“.

ჯილეხით დაავადება საქართველოს ყველა რეგიონში გვხვდება (*Kracalik I, et al, 2014; Kracalik I, et al, 2013*). ჯილეხით ავადობის მუდმივ საშიშროებას ქმნის ამ სნეულების მდგრადი და ხანგრძლივად მოქმედი ნაიდაგური კერები. გავრცელების ინტენსივობით სხვადასხვა რეგიონები მკვეთრად განსხვავდებიან ერთმანეთისგან. ყველაზე

არაკეთილსაიმედოა კახეთის, შიდა და ქვემო ქართლის დაბლობი და ივრის ზეგანი. ამ რეგიონებში ადამიანთა ჯილხით ავადობის მაჩვენებელი ყველაზე უფრო მაღალია. აქ არსებული თბილი კლიმატი, ზომიერი სინოტივე, ნიადაგის შემადგენლობა ქმნიან ხელსაყრელ პირობებს გარემოში ჯილხის სპორების ხანგრძლივი არსებობისთვის, რაც კარგად განვითარებულ მესაქონლეობასთან კავშირში განაპირობებს ჯილხით ავადობის მაჩვენებლის სიდიდეს. საქართველოში ეს მაჩვენებელი ყველაზე მცირეა დასავლეთ კავკასიონზე (მესტიის, ლენტეხის, ცაგერის და ნაწილობრივ, ონისა და ამბროლაურის რაიონები *(კუხალაშვილი თ, 2007)*).

საარქივო მასალებში საქართველოში 1882-1921 წწ. რეგისტრირებული იყო 636 არაკეთილსაიმედო პუნქტი, მოიცავდა თითქმის ყველა თანამედროვე რაიონს (65 ს - 69 რაიონიდან) *(კუხალაშვილი თ.გ.1974)*. ოფიციალური მონაცემების მიხედვით ამ წლებში დაინფიცირდა 16778 ცხოველი, საიდანაც დაეცა 8895 სული. ეპიზოოტია ჩვეულებრივ სეზონური ხასიათის იყო (ივნისიდან ოქტომბრამდე დაინფიცირდა 57,5%) (13).

1921-1940 წწ. საქართველოში დაფიქსირებული იყო 682 არაკეთილ-საიმედო პუნქტი. კუხალაშვილის ატლასში მოყვანილი მონაცემების მიხედვით, ინფიცირებული იყო 19345 სული საქონელი და 4411 ადამიანი. აღინიშნა ჯილხის შემთხვევები ძაღლებში – 1922 წელს 2 ძაღლი (სენაკის რ-ნი), 1924 წელს – 4 (წყალტუბოს რ-ნი), ხოლო 1925 წელს – 10 ძაღლი (წყალტუბოს რ-ნი) *(კუხალაშვილი თ.გ.1974; კუხალაშვილი თ.გ.1976)*.

მეორე მსოფლიო ომის პერიოდში ჯილხის შემთხვევებმა მნიშვნელოვნად მოიმატა, რადგან შესუსტდა ჯილხის საწინააღმდეგო ღონისძიებათა გატარება. ამ პერიოდში (1940-1945) რეგისტრირებულია 247 არაკეთილსაიმედო პუნქტი, დაინფიცირდა 2030 სული, ხოლო ადამიანთა დაავადების რიცხვმა 357-ს მიაღწია.

ომის შემდგომ პერიოდში ჯილხით დაავადება ძირითადად სპორადული ხასიათისაა. ქვეყნის ტერიტორიაზე არსებობს ჯილხის მრავალი ნიადაგური კერა, რაც განაპირობებს ავადობის ყოველწლიურ შემთხვევებს. ძირითადად ფიქსირდება დაავადების სპორადული შემთხვევები, თუმცა ადგილი აქვს ჯგუფურ შემთხვევებსაც. საქართველოში ჯილხზე ოფიციალური ცნობები საარქივო დოკუმენტებში შემონახულია ცალკეული სამედიცინო და ვეტერინარულ ექიმთა პატაკისა და სამუშაო

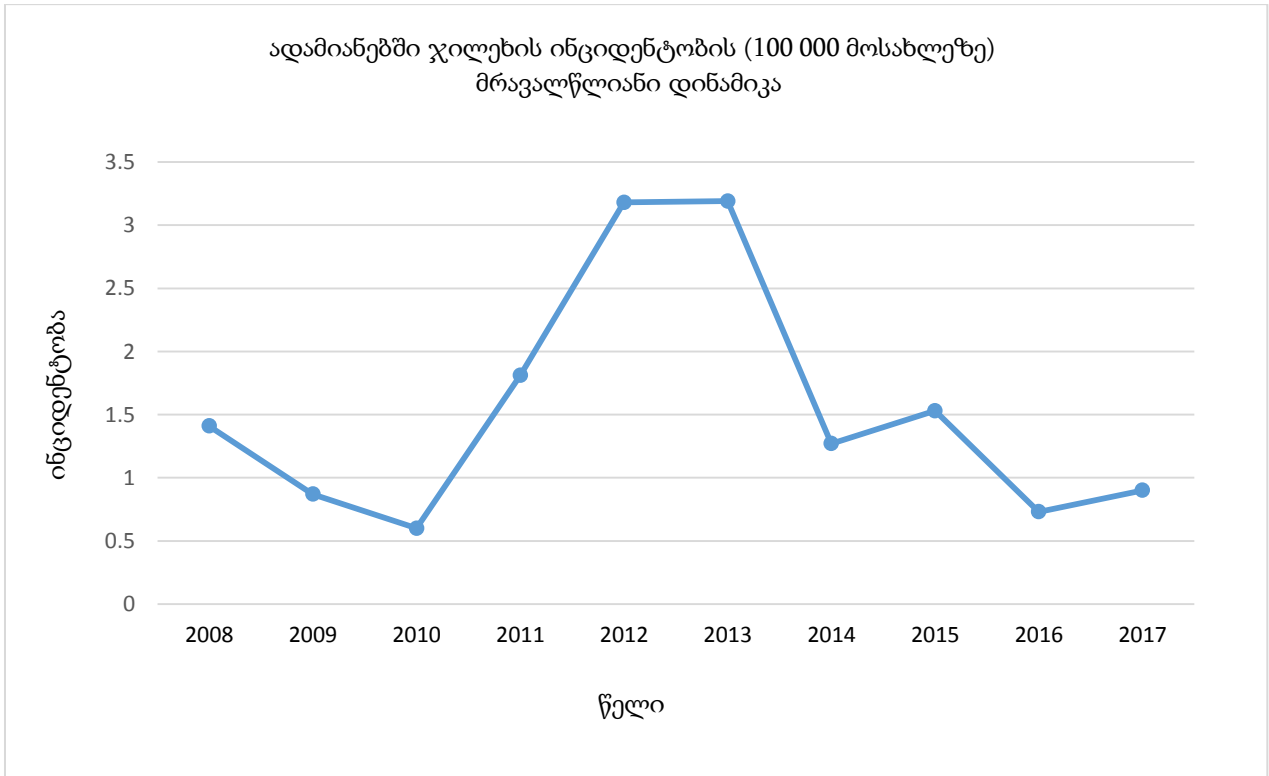
ანგარიშების სახით. 1960 წლიდან კი ჯილბით ადამიანთა დაავადების შემთხვევები რეგისტრირდება ყოველწლიურად.

საქართველოში ჯილბის ადამიანის შემთხვევების დინამიკა 2008-2017 წლებში:

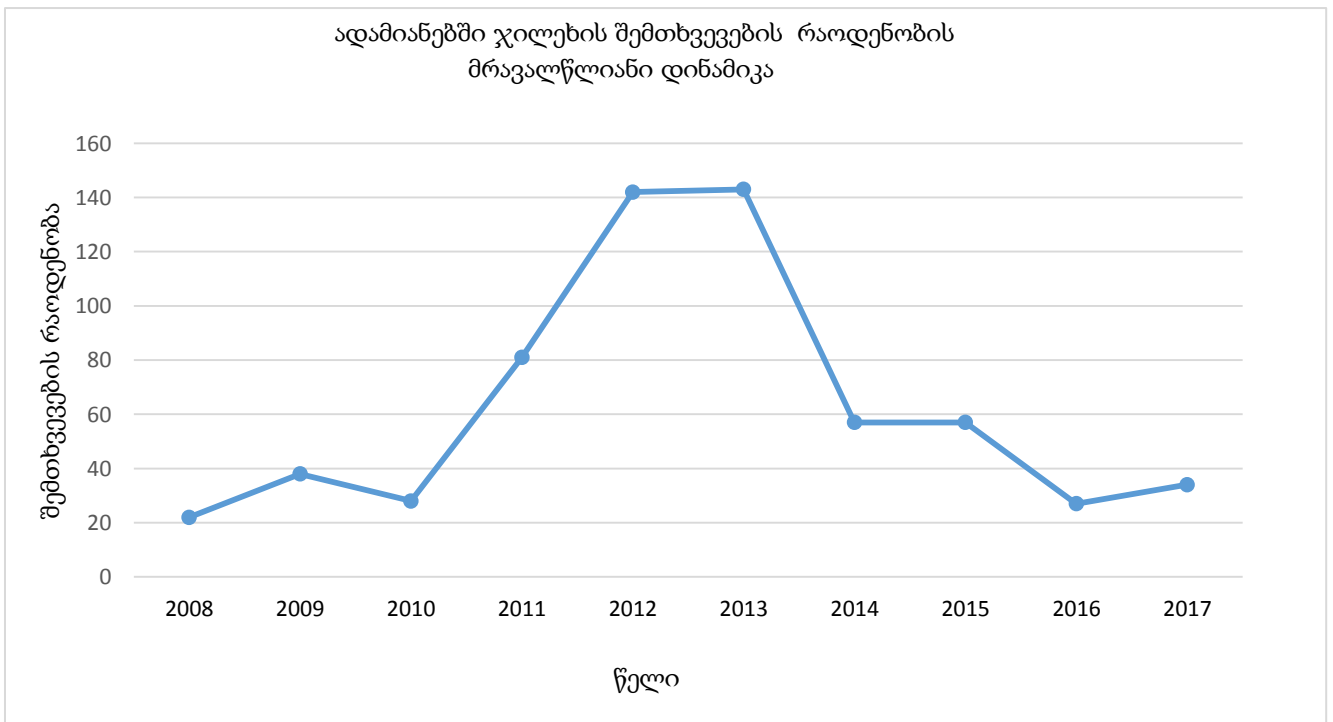
2008-2017 წლებში საქართველოში რეგისტრირებულია ჯილბის ადამიანთა დაავადების 629 შემთხვევა (სურათი 2; სურათი 3); მათგან 627 შემთხვევა იყო ჯილბის კანის ფორმა, საქართველოში პირველად დარეგისტრირებული ერთი-ოროფარინგიული ფორმა და ერთი მენინგელაური ფორმა (2017 წლის შემთხვევები).

ბოლო ათი წლის განმავლობაში 5 შემთხვევა დასრულდა ლეტალურად. 3 შემთხვევა ქვემო ქართლის რეგიონში: 2011 წელს - 1 შემთხვევა თეთრიწყაროს რაიონში, 2012 წ. - 1 შემთხვევა ქ.რუსთავში, 2013 წ. - 1 შემთხვევა გარდაბნის რაიონში, 2017 წ. - 1 შემთხვევა აჭარაში (ხელვაჩაურის რ-ნი, მენინგელაური ფორმა) და 2017 წ. - 1 შემთხვევა სამეგრელო ზემო სვანეთის რეგიონში (ქ. ფოთი, ჯილბის ოროფარინგიული ფორმა).

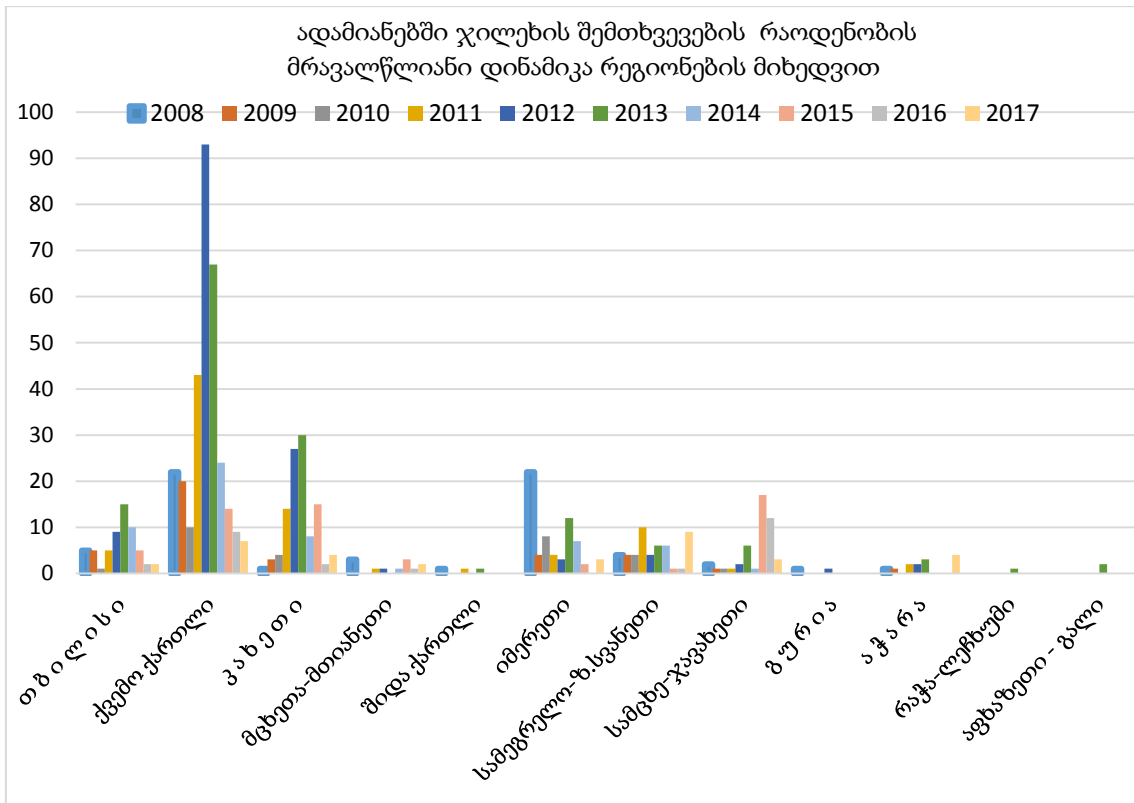
დადასტურებული კლინიკური შემთხვევების რაოდენობის მიხედვით ქვემო-ქართლი კახეთის და სამცხე ჯავახეთის რეგიონებთან ერთად შეიძლება ჩაითვალოს ჯილბის ერთ-ერთ ყველაზე მაღალი რისკის ტერიტორიებად (სურათი 4). 2008-2017 წლებში შემთხვევების 58% დაკავშირებულია დაავადებული საქონლის დაკვლა-გატყავებასა და ხორცის ადგილზე დამუშავებასთან (სურათი 5).



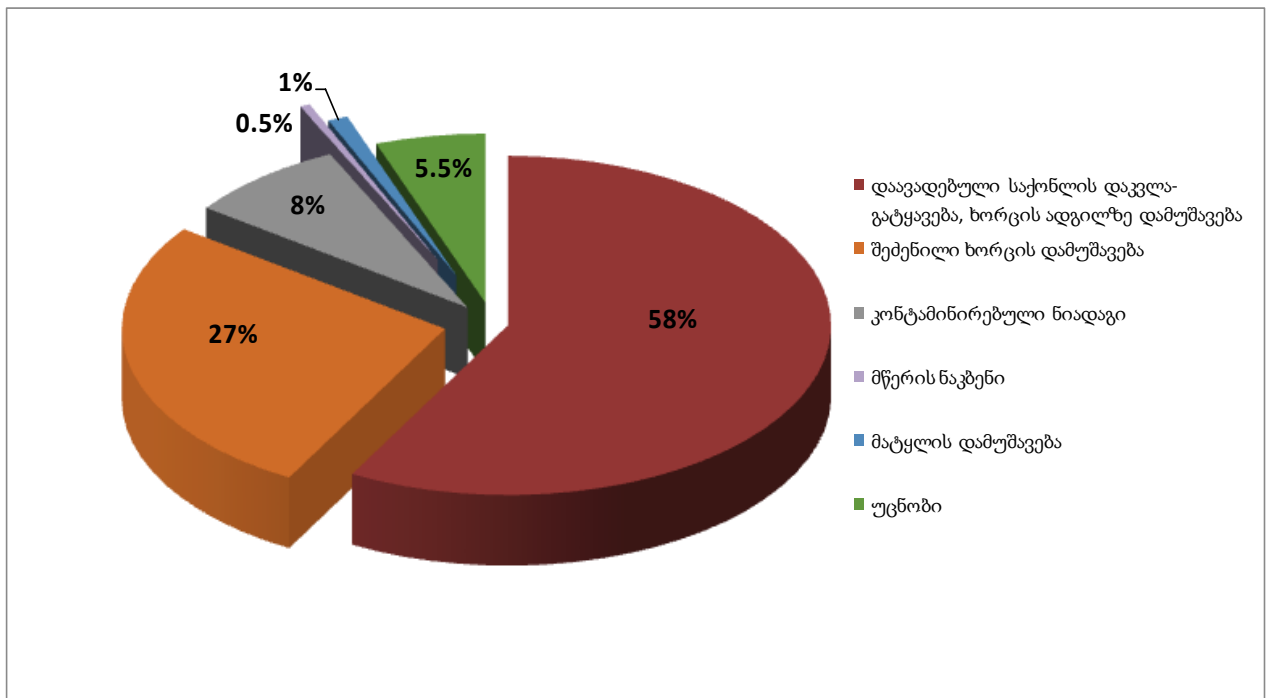
სურათი 2. ადამიანებში ჯილხის ინციდენტობა, 2008-2017 წწ



სურათი 3. ადამიანებში ჯილხის შემთხვევების რაოდენობა, 2008-2017 წწ



სურათი 4. ადამიანებში ჯილხის შემთხვევების გადანაწილება რეგიონების მიხედვით, 2009-2017 წწ



სურათი 5. ადამიანებში ჯილხის შემთხვევათა განაწილება ინფიცირების რისკის ფაქტორების მიხედვით, 2008-2017 წ.წ.

2.7 ჯილახის კონტროლი და პროფილაქტიკა

2.7.1 ჯილახის კონტროლი

კონტროლი და, მსხვილფეხა საქონლის შემთხვევაში, ჯილახის ერადიკაცია განაპირობებს ინფექციის ციკლის წყვეტას. თუ ცნობილია პოტენციური ინფექციის წყარო, დაუყოვნებლივ უნდა მოხდეს მისი ელიმინაცია. იმის გათვალისწინებით, რომ ჯილახი უმთავრესად ბალახისმჭამელ ძუძუმწოვრთა დაავადებაა, კონტროლის ფოკუსირება ხდება შინაურ მსხვილფეხა საქონელზე. ფერმაში დაავადების აფეთქების შემთხვევაში კონტროლის ზომები მოიცავს ლემ(ებ)ის სათანადო გაუვნებელყოფას, ინფექციის ადგილისა და ტესტირების გამოყენებული მასალების დეკონტამინაციას და სხვა ცხოველების მკურნალობის და/ან ვაქცინაციის დაწყებას, საჭიროების მიხედვით. ლემის გაუვნებელყოფის საუკეთესო მეთოდია დაწვა. ჯილახის ვაქცინები მსხვილფეხა საქონლისთვის ხელმისაწვდომია უმეტეს ქვეყნებში, განსაკუთრებით კი იქ, სადაც ყოველწლიურად ფიქსირდება აფეთქებები ან სპორადული შემთხვევები. ვაქცინა ადამიანებისთვის იწარმოება მხოლოდ ოთხ ქვეყანაში და გამოიყენება მხოლოდ პროფესიული რისკის ქვეშ მყოფ პირებში, მათივე საზღვრებში. შესაბამისად, ამჟამად მათთან წვდომა ძალიან შეზღუდულია. ენზოოტურ ველურ ბუნებაში, სადაც მოქმედებს ხელშეუხებლობის პოლიტიკა, ჯილახზე კონტროლის ზომების გატარება შესაძლებელია მხოლოდ გადაუდებელ სიტუაციებში ან კონკრეტული სახეობის განადგურების რისკის შემთხვევაში. ამ საკითხის განხილვა უნდა მოხდეს სხვაგვარად შედარებით მცირე ან კომერციულ სანადირო ტერიტორიებზე. მნიშვნელოვანია დარგთაშორისი კოოპერაცია ადგილებში, სადაც ფერმებს ესაზღვრება მსგავსი ველური ბუნება. (*WHO, 4th edition, 2008*)

2.7.2 ვაქცინაცია

ვაქცინა, რომელიც ლიცენზირებულია აშშ-ში მხოლოდ ვეტერინარული მოხმარებისთვის, არის ცოცხალი სპორების შემცველი პრეპარატი (*Anthrax Spore Vaccine*), დამზადებული Colorado Serum Company-ის მიერ (*Colorado Serum Company. Anthrax live spore vaccine information leaflet*). ვაქცინაში შემავალი ჯილახის შტამი

შემუშავებულ იქნა შტერნის მიერ, 1930-იან წლებში (*Sterne, M. 1939; Sterne, M. 1939; Turnbull, P. 1991*). *B. anthracis*-ის შტერნის შტამი არაკავსულირებულია და ატენუირებული (*Ivins B, Welkos S, 1988*). მას არ აქვს კავსულის მაკოდირებელი pXO2 პლაზმიდი, თუმცა ინარჩუნებს pXO1 პლაზმიდს, რომელიც აკოდირებს ეგზოტოქსინს. სხვადასხვა კვლევის მიხედვით დადგენილია აღნიშნული ვაქცინის უპირატესობა უჯრედებისგან თავისუფალ ვაქცინებთან შედარებით, ვინაიდან იძლევა ძლიერ ვირულენტური შტამებისგან დაცვის საშუალებასაც. ეს შესაძლოა გამოწვეული იყოს CMI საპასუხო რეაქციის გამოწვევით ცხოველებში (*Ivins B, et al, 1988; Mizrahi, A (ed). 1990; Pezard C, et al, 1995; Turnbull, P. 1991*). ცოცხალი სპორების შემცველი ვაქცინა საჭიროებს მხოლოდ ერთ საწყის იმუნიზაციას (ენდემურ კერებში რეკომენდებულია ორი იმუნიზაცია), თანმდევი ყოველწლიური ბუსტერ დოზით - სრული იმუნიტეტის შესაქმნელად (*Colorado Serum Company. Anthrax live spore vaccine information leaflet*). მიუხედავად ამისა, ჯილეხის აღნიშნულ ვაქცინას აქვს ორი უარყოფითი თვისება. ვეტერინარული ვაქცინისთვის გამოყენებული შტამი ინარჩუნებს ინექციის არეში ლოკალური ნეკროზის, ცხოველთა ზოგიერთ სახეობაში კი, მაგალითად თხებსა და ლამებში - დაავადების განვითარების შესაძლებლობას (*Ivins B, et al, 1988; Mizrahi, A (ed). 1990*). დაავადების გამოწვევის რისკი, მიუხედავად იშვიათი შემთხვევებისა, წარმოადგენს მიზეზს, რის გამოც დასავლეთ ევროპა თავს იკავებს ადამიანების ცოცხალი ვაქცინით იმუნიზაციისგან (*Mizrahi, A (ed). 1990*).

ადამიანისთვის განკუთვნილი ცოცხალი ვაქცინების მიმართ მიდგომა სხვაგვარი იყო ჩინეთსა და რუსეთის ფედერაციაში (*Pomerantsev et al., 1996; Stepanov AS, et al, 1996*). ამ მხრივ მათი დამოკიდებულება ცხოველებში გამოსაყენებლად დამზადებული ვაქცინების მსგავსია. ჩინეთსა და რუსეთის ფედერაციაში ცოცხალი სპორების შემცველი ვაქცინები მზადდება და ლიცენზირებულია ადამიანებში გამოსაყენებლად. რუსული ვაქცინა, რომელიც 1930 და 1940-იანი წლებით თარიღდება (*Shlyakhov EN, Rubinstein E, 1994*), იყენებს STI-1 შტამს, რომელიც წარმოშობით შტერნის 34F2 შტამის მსგავსია (STI წარმოიქმნა შტამიდან “Krasnaya Niva”, რომელიც გამოიყო ჯილეხით დაღუპული ცხენიდან (*Cherkasskiy, personal communication, 2002*). 1953 წელს მან მოიპოვა ლიცენზია ადამიანებში სკარიფიკაციის გზით, ხოლო 1959 წელს - კანქვეშ შესაყვანად.

ხელმისაწვდომი ინფორმაციის თანახმად, რუსული ვაქცინის მოპოვება შესაძლებელია რუსეთის ფედერაციის საზღვრებს მიღმა. რაც შეეხება ჩინეთს, ის ამზადებს მხოლოდ ეროვნული საჭიროებისთვის საკმარის რაოდენობას და ჩინური ვაქცინა არ არის ხელმისაწვდომი ქვეყნის გარეთ. 1950-1960-იან წლებში რუსი მეცნიერების მიერ ჩატარდა კვლევები ინჰალაციის გზით იმუნიზაციის შესაძლებლობის დასადგენად. ცხოველთა სხვადასხვა სახეობაში ინჰალაციის გზით რეალური, დამცველობითი პოტენციალის მქონე იმუნიტეტის შესაქმნელად საჭირო აღმოჩნდა ცოცხალი ვაქცინის დიდი ინჰალაციური დოზები (20-50 მილიონი და მეტი სპორა) (*Anon., 1967; Lebendinskii, 1971; Ogarov & Gapochko, 1975*). ამ დოზებით ვაქცინის შტამმა გამოიწვია ზოგადი ინფექცია. ლებენდინსკიმ (1971) განიხილა 1958-1967 წლებში გამოქვეყნებული მრავალი სტატია, რომლებიც აღწერდა ჯილეხის აეროზოლიზებული ვაქცინის შემოწმებას 4000 ადამიანზე დოზებით: 15-300 მილიონი STI შტამის სპორა. შემდგომ 260 ადამიანს იმუნიზაცია ჩატარდა STI შტამის სპორების შემცველი, ძლიერ დისპერსიული თხევადი აეროზოლით. STI ვაქცინის ეფექტურობა განისაზღვრება ანთრაქსინის ტესტით. ანთრაქსინი არის მაღალი ტემპერატურის მიმართ მდგრადი პოლისაქარიდ-პროტეინ-დნმ-ის კომპლექსი, რომელიც მიიღება *B. anthracis*-ის არაკავსულირებული შტამისგან. ეს კომპლექსი არ შეიცავს *B. anthracis*-ის მიერ პროდუცირებულ კავსულარულ ან ტოქსიგენურ ნივთიერებებს (*Shlyakhov E, et al, 1997*). ანთრაქსინის კანის ტესტის მუშაობის პრინციპი ტუბერულინის კანის სინჯის მსგავსია და ეფუძნება უჯრედულ იმუნიტეტს (*Sharma M, et al, 1996; Shlyakhov E. 1970*). ანთრაქსინის კომპლექსის ინექცია ხდება ინტრადერმულად, შედეგები კი იკითხება 24 საათის შემდეგ. დადებითი რეაქციის შემთხვევაში ვლინდება ერთემა დაახლოებით 9მმ დიამეტრით და ინდურაციით, რაც პერსისტირებს 48 საათის განმავლობაში (*Shlyakhov E. 1970*). ტესტი სარწმუნოდ განსაზღვრავს ვაქცინით ინდუცირებული იმუნიტეტის არსებობას გვინეის ღორებში, ცხვრებსა და ადამიანებში, ისევე, როგორც პაციენტებში, რომლებიც 20-30 წლით ადრე დაავადებული იყვნენ ციმბირის წყლულით, თუმცა მოგვიანებით აღარ უვლინდებოდათ *B. anthracis* პროტეინების საწინააღმდეგო ანტისხეულები. ვიდრე ინფორმაცია CMI-ის როლის შესახებ ჯილეხის მიმართ სპეციფიკური იმუნიტეტის შექმნაში მწირი რჩება, უახლესმა კვლევებმა დაადგინეს

ცოცხალი ვაქცინის (არა აუცილებლად ცოცხალი სპორების შემცველი) უპირატესობა ქიმიური კომპონენტებით მიღებულ ვაქცინასთან შედარებით (*Shlyakhov E, et al, 1997*). მიუხედავად ამისა, პაციენტები და სამედიცინო პერსონალი თავს იკავებს ცოცხალი სპორების შემცველი ვაქცინის გამოყენებისგან იმ შემთხვევაშიც კი, თუ შტამი არ არის ვირულენტური, მისი ვირულენტურ ფორმად გარდაქმნის შიშის გამო.

ჯილახვის ვაქცინა, რომელიც ლიცენზირებულია აშშ-ში ადამიანებში გამოსაყენებლად, შემუშავებულია მიჩიგანის საზოგადოებრივი ჯანდაცვის დეპარტამენტის (MDPH), ხოლო დამზადებული - BioPort Corporation-ის მიერ (*Anthrax vaccine adsorbed description leaflet, 1987*). AVA (ადსორბირებული ჯილახვის ვაქცინა) არის ვაქცინის ქვეჯგუფი, რომელიც წარმოადგენს უჯრედებისგან თავისუფალ ექსტრაქტს. ვაქცინა წარმოადგენს ალუმინის ჰიდროქსიდს, რომელიც ადსორბირდება სტერილური კულტურის ფილტრატის შემცველ PA-ზე (*Ivins B, et al, 1994*). ფილტრატი წარმოიქმნება *B. anthracis*-ის არაკავსულირებული, ტოქსიგენური შტამის - V77-NPI-R-ის - მაფერმენტებელი კულტურისგან (*Ivins B, et al, 1994; Ivins B, et al, 1988*). ვაქცინაში შემავალი შტამი კულტივირდება სინთეზურ ნიადაგზე, რომელიც ხელს უწყობს PA-ის სინთეზსა და სეკრეციას ზრდის ფაზაში, უპირატესად სხვა პროტეინებზე (*Ivins B, et al, 1994*). ადამიანის ჯილახვის ვაქცინას აქვს რამდენიმე უარყოფითი თვისება. სრულყოფილი იმუნიტეტის შესაქმნელად საჭიროა იმუნიზაციის 6 პროცედურის ჩატარება 8 თვის განმავლობაში, რასაც თან სდევს ყოველწლიური ბუსტერ დოზის მიღების საჭიროება (*Ivins B, et al, 1988, Anthrax vaccine adsorbed description leaflet, 1987*). იმ ადამიანთა 35%-ს, რომლებიც იღებდნენ აღნიშნულ ვაქცინას, დაფიქსირდა ადგილობრივი რეაქციები ლოკალური ტკივილის, სიწითლისა და ანთების სახით (*Ivins B, et al, 1988; Ivins B, et al, 1994; Singh Y, et al, 1998*). ვაქცინის კიდევ ერთი ნაკლია ის, რომ მან ვერ შეძლო გვინეის ღორების დაცვა *B. anthracis*-ის მაღალვირულენტური შტამების აეროზოლით ინფიცირებისა, იმუნიზაციის სრული კურსის გავლის შემდეგაც კი (*Coulson N, et al, 1994; Ivins B, Welkos S, 1988; Ivins B, et al, 1994; Ivins B, Welkos S, 1988*).

ვაქცინაციისათვის უკუჩვენებად ითვლება: მწვავე ინფექციური და არა-ინფექციური დაავადებები; ქრონიკული დაავადებები გამწვავების სტადიაში; სისხლის ავთვისებიანი

დაავადებები; მძიმე პროგრესირებადი სომატური დაავადებები; იმუნოდეფიციტური მდგომარეობა; კანის ქრონიკული დაავადებები; ფეხმძიმობა.

გეგმიური აცრები უტარდებათ ეპიდჩვენების მიხედვით ლაბორატორიის თანამშრომლებს, რომლებსაც მუშაობა უხდებათ ჯილეხის ცოცხალ კულტურაზე; ზოოვეტმუშაკებს და იმ პირებს, რომლებიც პროფესიულად დაკავებულნი არიან პირუტყვის დაკვლისწინა შენახვით, დაკვლით, გატყავებით და ხორცის აქნით; ცხოველური წარმოშობის ნედლეულის შეგროვებით, შენახვით, ტრანსპორტირებით და პირველადი გადა-მუშავებით დაკავებულ პირებს. საქართველოში ლაბორატორიის თანამშრომლებს ჯილეხის გეგმიური აცრა STI ვაქცინის გამოყენებით უტარდებათ. რაც შეეხება საქართველოში ცხოველების ვაქცინაციას, აქ გამოიყენება რუსული წარმოების ვაქცინა - „Вакцина против Сибирской Язвы животных из штамма 55-ВНИИВВиМ живая жидкая“. ასევე რამოდენიმე წლის წინ გამოყენებული იქნა საქართველოში წარმოებული „შ.პ.ს. იმუნოგენის“ მიერ წარმოებული ვაქცინა. ვაქცინაცია ცხოველებში, მიმდინარეობს ყოველწლიურად, გაზაფხულზე ვაქცინის ინსტრუქციის შესაბამისად.

2.8 ჯილეხის ლაბორატორიული დიაგნოსტიკა

მსოფლიოს რეფერალურ ლაბორატორიებში ჯილეხის ლაბორატორიული დადასტურებისთვის ფართოდ გამოიყენება ბაქტერიოლოგიური, სეროლოგიური და იმუნოჰისტოქიმიური მეთოდები, ასევე ტესტი ჯილეხის დამცავი ანტიგენის (PA) აღმოსაჩენად და პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია დნმ დეტექციის მიზნით (*Bell, C, et al, 2002; Espy, M. J, et al, 2006*).

ადამიანებში ჯილეხის ლაბორატორიული დიაგნოსტიკისათვის საკვლევი მასალა აუცილებლად უნდა იქნას აღებული ანტიბიოტიკებით მკურნალობის დაწყებამდე. აღსანიშნავია, რომ ლაბორატორიული კვლევის ეფექტურობას არსებითად ამცირებს უკვე დაწყებული ანტიბიოტიკოთერაპია; ანტიბიოტიკების მიცემიდან 24 საათში უკვე ხდება გამომწვევის ვეგეტაციური ფორმების მოსპობა.

საქართველოში, ისევე როგორც მთელს მსოფლიოში ჯილეხის ლაბორატორიული დიაგნოსტიკა/კონფირმაცია კომპლექსურია და მოიცავს შემდეგ მიმართულებებს:

- ბაქტერიოლოგიური: კულტურის იზოლაცია კლინიკური ნიმუშებიდან (სისხლი, წყლულის შიგთავსი, განავალი, ლიქვორი და ა.შ)
- სეროლოგიური: ELISA - სისხლის შრატში ჯილეხის საწინააღმდეგო ანტისხეულების (IgG და IgM) აღმოჩენა; ELISPOT - უჯრედული იმუნიტეტის განსაზღვრა
- მოლეკულური: Real-Time PCR პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია რეალურ დროში - კლინიკურ ნიმუშში ჯილეხის ვირულენტობის განმსაზღვრელი პლაზმიდებისა (pXO1; pXO2) და ქრომოსომის დეტექცია; აღნიშნული მეთოდით ასევე ხდება გამოყოფილი კულტურის საბოლოო დადასტურება.

ჩამოთვლილი მეთოდებიდან Real-Time PCR-ს განსაკუთრებული ადგილი უჭირავს არაკულტივირებადი ნიმუშების ტესტირებაში; აღნიშნული მეთოდის სპეციფიურობა და მაღალი მგრძობელობა ზრდის მიკრობის დეტექციის შესაძლებლობას ისეთ ნიმუშებშიც კი, სადაც მიკროორგანიზმის რაოდენობა ძალიან დაბალია და იზოლაციის მიღება ვერ ხერხდება.

2.9 ჯილეხის მკურნალობა

ჯილეხის მკურნალობისათვის არსებობს აქვთ რამდენიმე ვარიანტი ანტიობიოტიკებისა და ანტიტოქსინის გამოყენების ჩათვლით. პაციენტები მწვავე ჯილეხის ფორმით აუცილებლად უნდა იქნენ ჰოსპიტალიზირებულები; შესაძლოა მათ დასჭირდეთ ისეთი აგრესიული მკურნალობა როგორცაა სითხის ხანგრძლივი დრენირება და ფილტვების მექანიკური ვენტილაცია.

ანტიბიოტიკოთერაპია იწყება მყისიერად დაავადების პირველი ნიშნების გამოჩენისთანავე და აუცილებლად საკვლევი მასალის აღების შემდეგ.

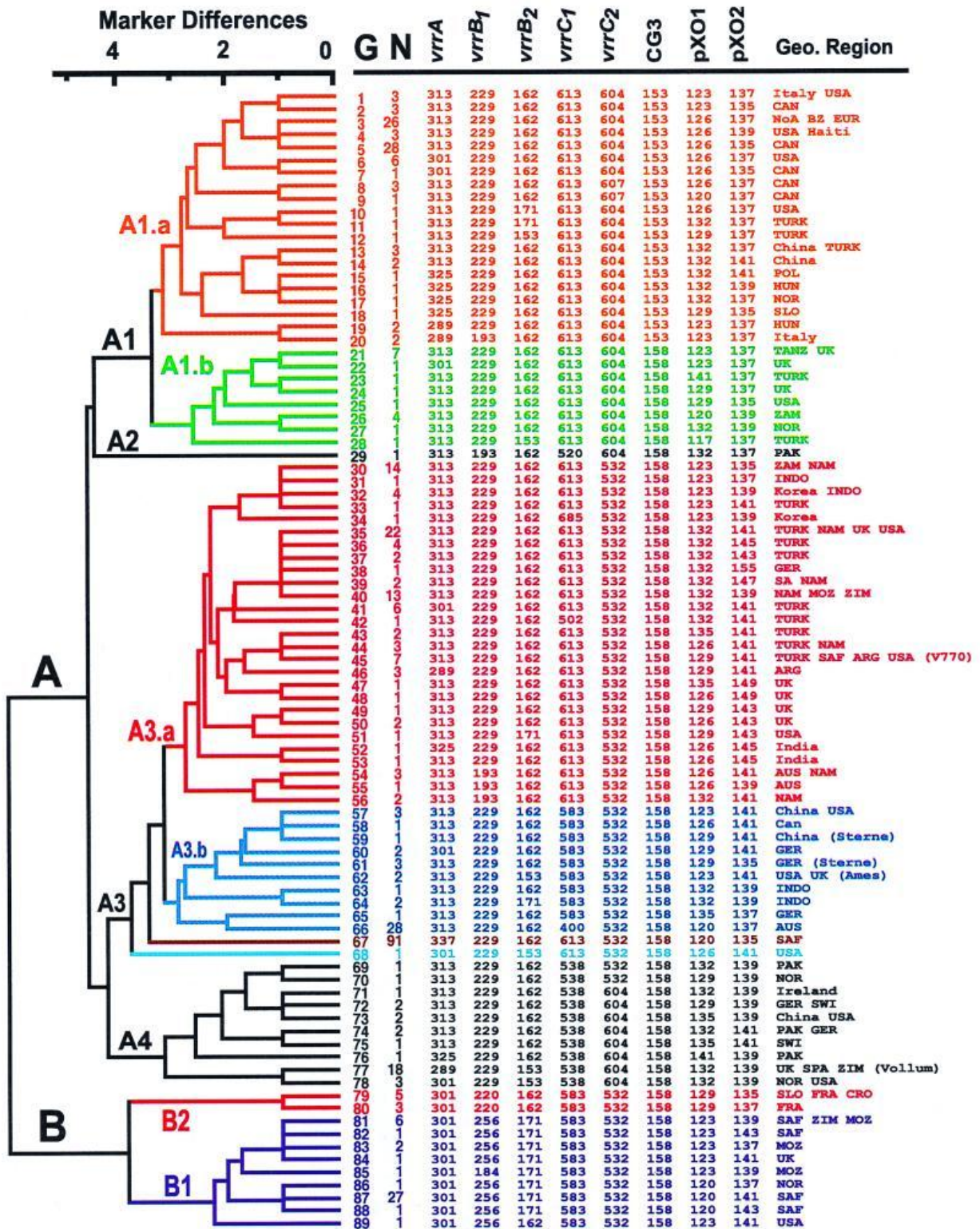
ნახევარი საუკუნის წინ ჰერმან გოლდმა (1955 წ) დაწერა: „პენიცილინი და ფართო სპექტრის ანტიბიოტიკებმა იმდენად გაამარტივეს ჯილეხის მართვა, რომ თავისუფლად შეიძლება ითქვას - ჯილეხი, როგორც დაავადება სერიოზულ საფრთხეს აღარ წარმოადგენს.“ მას შემდეგ, საქართველოშიც ხანგრძლივი დროის განმავლობაში ჯილეხის მკურნალობის არჩევის პრეპარატი იყო ბენზილპენიცილინი (*Jamie WE, 2002*); თუმცა, ბოლო წლებში *B. anthracis* პენიცილინრეზისტენტული შტამების გაჩენამ გამოიწვია სხვა პრეპარატების ჩართვის საჭიროება; უკვე დღეს, არჩევის პრეპარატად გამოიყენება ციპროფლოქსაცინი. სასტარტო პრეპარატია ციპროფლოქსაცინი, ალტერნატიული – დოქსიციკლინი. მძიმე შემთხვევებში ინიშნება ციპროფლოქსაცინი ან დოქსიციკლინი + არჩევის პრეპარატი მგრძობელობის მიხედვით (*ჯილეხის მართვის პროტოკოლი, 2015*).

ჯილეხის მენინგეალური და ფილტვისმიერი ფორმის მკურნალობა მიმდინარეობს ერთნაირად; გამომდინარე იქიდან, რომ დოქსიციკლინი ვერ ლახავს ჰემატონენცეფალურ ბარიერს, მის ნაცვლად გამოიყენება ი.ვ. ფტორქინოლონები; ასევე რეკომენდირებულია კორტიკოსტეროიდების გამოყენება მენინგეალური ფორმის დროს თავის ტვინის შეშუპების რისკის შესამცირებლად (*ჯილეხის მართვის პროტოკოლი, 2015*).

2.10 ჯილეხის მოლეკულური ტიპირება და გლობალური ფილოგენეტიკა

B. anthracis ერთ-ერთი ყველაზე მონომორფული სახეობაა, რაც ნიშნავს იმას, რომ ნებისმიერი წყაროდან თუ გეოგრაფიული ლოკაციიდან წარმომავალი იზოლატები ფენოტიპურად და გენოტიპურად თითქმის ერთმანეთის იდენტურია. ფენოტიპურად, შტამებს შორის სხვაობის გამოვლენა მხოლოდ ისეთი არარაოდენობრივი ან ნახევრად-რაოდენობრივი მახასიათებლებით არის შესაძლებელი, როგორებიცაა კოლონიის მორფოლოგია, ფლოკულაცია თხევად საკვებ არეში, უჯრედის ზომა, გამრავლების სიჩქარე, სპორების წარმოქმნის ეფექტურობა, LD50 ცხოველთა სინჯებში და სხვ. ამ სხვაობათა გენეტიკური საფუძველი ჯერ კიდევ არ არის დადგენილი, ხოლო გენომის სხვაობის დეტექცია მოლეკულურ დონეზე საკმაოდ რთულია. ბიოქიმიური,

სეროლოგიური და ფაგოტიპირების მეთოდები, რომლებიც გამოიყენება სხვა პათოგენების შემთხვევაში, არ არის ღირებული *B. anthracis*-ის სხვადასხვა შტამების იდენტიფიცირებისთვის. უკანასკნელ წლებში მნიშვნელოვანი პროგრესი იქნა მიღწეული მსოფლიო მასშტაბით სხვადასხვა იზოლატებს შორის ფილოგენეტიკური ურთიერთკავშირის განსაზღვრის თვალსაზრისით; ასე მაგალითად, მრავლობითი ლოკუსების ტანდემურად განმეორებადი თანმიმდევრობების ცვლადი რაოდენობის ანალიზის (Multi Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis - MLVA) მეშვეობით (*Keim et al, 2000; Keim & Smith, 2002*). MLVA მეთოდი დაფუძნებულია გენომში, *B. anthracis*-ის ქრომოსომებსა და პლაზმიდებში შტამის მიმართ სპეციფიკურ, ნუკლეოტიდების განმეორებად თანმიმდევრობათა (VNTR) აღმოჩენის არსებობაზე; თავდაპირველად MLVA ტიპირებისათვის რვა მარკერიანი სისტემა იქნა გამოყენებული (MLVA-8), რის საფუძველზეც მოხდა მსოფლიოს სხვადასხვა ქვეყნებიდან გამოყოფილი 426 იზოლატის სეპარაცია ორ ძირითად კლონალურ ჯგუფად - A განშტოება ოთხი ან მეტი, ხოლო B - ორი მცირე კლასტერით. A - მსოფლიოში ყველაზე ფართოდ გავრცელებულ ჯგუფს წარმოადგენს, B1 აღმოჩენილია მხოლოდ სამხრეთ აფრიკაში, ხოლო B2 - მთელ მსოფლიოში აფრიკის გარდა (სურათი 6) (*Keim et al, 2000*). აღსანიშნავია, რომ საქართველოში და სამხრეთ კავკასიის რეგიონში შესწავლილი მოცირკულირე ჯილეხის შტამები განეკუთვნება MLVA კლასტერ A-ს. (*Merabishvili M, et al, 2006; Durmaz R, et al, 2012; Eremenko EI, et al, 2012*) კერძოდ კი, შესწავლილი იყო საქართველოს სხვადასხვა რეგიონებიდან იზოლირებული ჯილეხის 18 შტამი, რომლებიც კვლევის შედეგების თანახმად განეკუთვნენ MLVA A3 კლასტერს. ამავე კლასტერში ნანახი იყო ჯილეხის თურქული იზოლატებიც, რაც მეტყველებს სამხრეთ კავკასია-თურქეთის რეგიონში საერთო გენოტიპების ცირკულაციაზე.



სურათი 6. MLVA-8 გენოტიპირების შედეგად მიღებული ფილოგენეტიკური ხე; A და B კლასტერებში გაერთიანებული 89 უნიკალური გენოტიპი

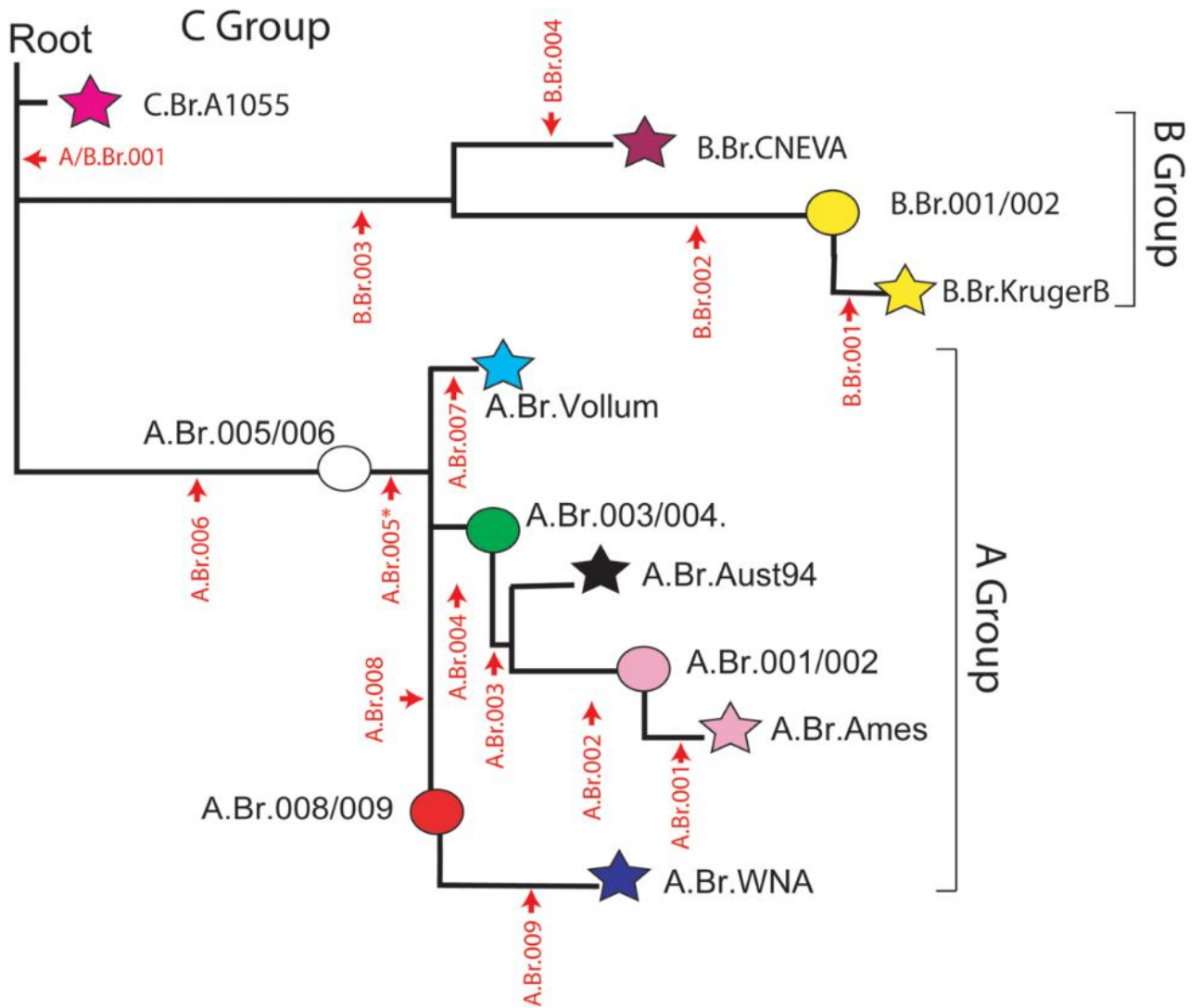
მიზეზი, თუ რატომ არის A შტამების გლობალური გავრცელება ძალიან ფართო, ხოლო B შტამების - რაოდენობრივად შეზღუდული, უცნობია. ჰიუ ჯონსი გვთავაზობს ჰიპოთეზას (*personal communication, 2003*), რომ ეს შესაძლოა გამოწვეული იყოს A (და არა B) შტამების მიერ ლატენტური ინფექციის გამოწვევის შესაძლებლობაზე. სმიტმა და ჰიუ ჯონსმა აღმოაჩინეს ზრდისა და სპორულაციის განსხვავებული მახასიათებლები სხვადასხვა გენოტიპში და ივარაუდეს, რომ ამგვარი სხვაობა წარმოადგენდა სხვადასხვა გარემო პირობებთან ადაპტაციის შედეგს (*Keim & Smith, 2002*). მათ მოახდინეს ამ კონცეფციის ილუსტრაცია ჯილეხზე პასუხისმგებელი ორი გენოტიპის სახით ალბერტაში, კანადაში. რაც უფრო ჩრდილოეთით იყო გავრცელებული შტამი, მით მეტი იყო მათი (*in vitro*) ზრდისა და სპორულაციის სიჩქარე. სმიტისა და ჰიუ ჯონსის თანახმად, ეს ასახავდა ადაპტაციას მეტად მკაცრი კლიმატის მიმართ, სადაც გვამი უფრო სწრაფად ცივდება და შეზღუდულია სიკვდილის შემდგომ ზრდისა და სპორულაციის დრო. MLVA-მ შეასრულა მნიშვნელოვანი როლი კრიმინალურ გამოძიებებში 2001 წელს აშშ-ში ჯილეხის სპორებით დაინფიცირებული წერილების საქმეში ინფექციის წყაროს განსაზღვრისას. გონივრულია, სახეობათა მონომორფიზმის განსაკუთრებული ხარისხი მიეწეროს ფაქტს, რომ *B. anthracis* სხვა ბაქტერიულ და პათოგენურ სახეობებთან შედარებით გამრავლებისთვის საჭირო გარემოს ბევრად უფრო იშვიათად პოულობს.

დროთა განმავლობაში MLVA ტიპირების სქემა რომელიც მოიცავდა 8 ლოკუსის მიხედვით ტიპირებას გაფართოვდა და უკვე დღეს მრავალ ქვეყანაში 31 ლოკუსი გამოიყენება (*Beyer, W, et al, 2012; Thierry S, et al, 2014; Liu D, et al, 2017*).

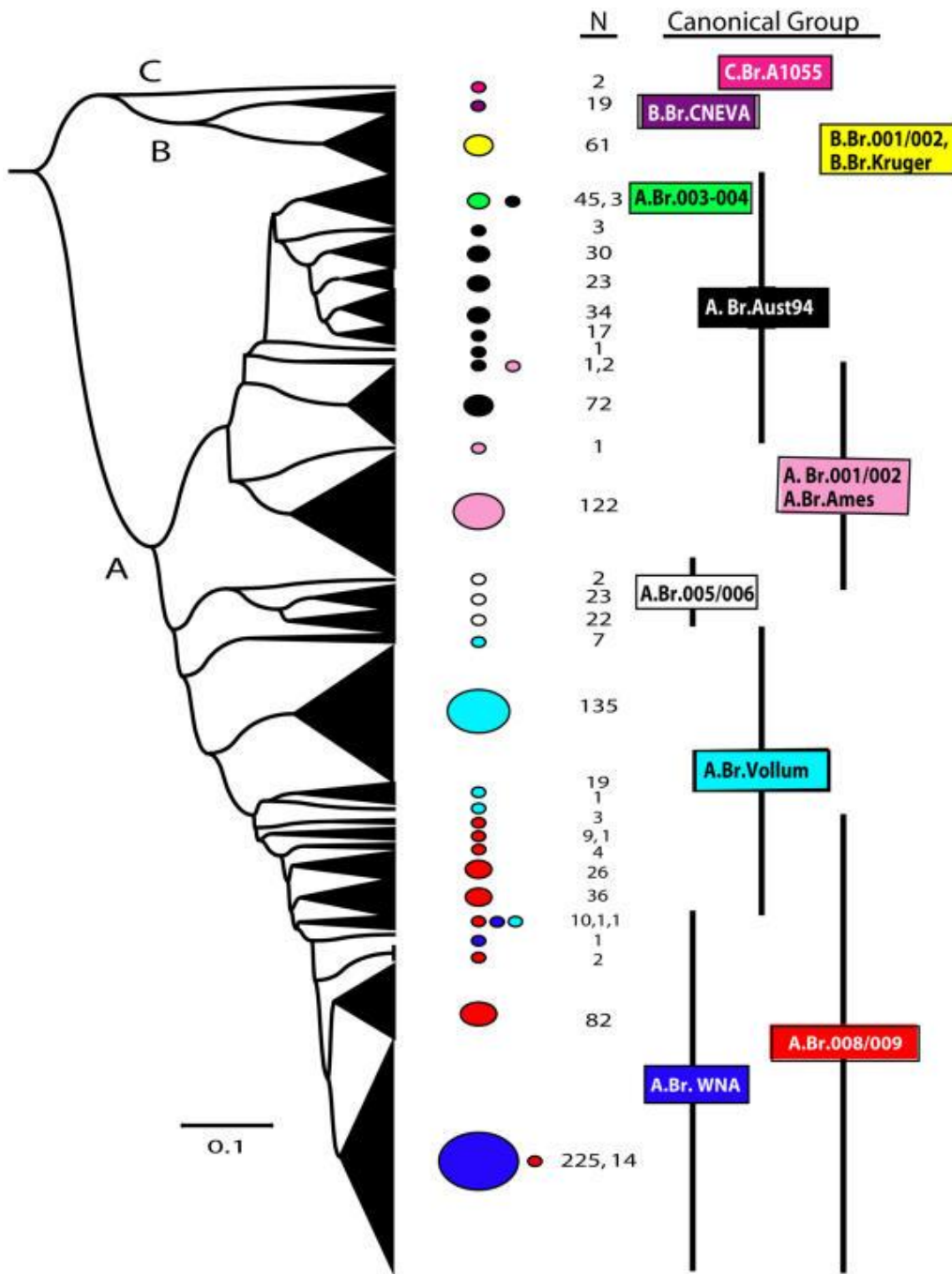
მეორე ძირითადი და ულტრათანამედროვე მეთოდი, რომელიც დღეს ჯილეხის გამომწვევის ფილოგენეტიკური კვლევებისთვის გამოიყენება არის გენომში ერთ-ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმების (Single Nucleotide Repeats - SNP) აღმოჩენაზე დაფუძნებული კვლევა (*Keim P, et al, 2004; Stephens AJ, et al, 2006; Van Ert, et al, 2007*), რომლის ფარგლებშიც ჩატარდა *B. anthracis*-ის 7 შტამის (C.USA.A1055, KrugerB, CNEVA.9066, Ames, Australia94, Vollum, Western North America) გენომის სრული

სექვენირება იშვიათი ერთ-ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმების (SNPs) გამოვლენის მიზნით (*Van Ert, et al, 2007*); რასაც მოჰყვა ამ მახასიათებლების ფილოგენეტიკური გარდაქმნა ევოლუციურ მოდელად. აღნიშნული ანალიზის შედეგად მოხდა იმ ერთ-ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმების (SNPs) იდენტიფიცირება, რომლებიც განსაზღვრავს სახეობათა ძირითად კლონურ ჯგუფებს (კანონიკური SNP-ები).

აღნიშნული კანონიკური SNP-ები, 15 ცვლადი რაოდენობის ტანდემური განმეორებების (VNTR) მარკერებთან ერთად, გამოყენებულ იქნა 42 ქვეყნიდან *B. anthracis*-ის 1,033 იზოლატის შემცველი კოლექციის სუბტიპირების მიზნით, გენოტიპის მასშტაბური მონაცემთა ბაზის შექმნის მიზნით. ამ ანალიზის შედეგად იზოლატების კლასიფიცირება მოხდა სამ ძირითად ჯგუფად: A, B და C, რომლებიც, თავის მხრივ, იყოფოდა 12 კლონურ ქვეჯგუფად, საბოლოოდ კი - 221 უნიკალურ MLVA15 გენოტიპად (*Van Ert, et al, 2007*) (სურათი 7, სურათი 8). ეს იშვიათი გენომური ვარიაცია გამოყენებულ იქნა *B. anthracis* ევოლუციური განვითარების ასახვისა და მრავალფეროვნების გლობალური ნიმუშების დადგენის მიზნით. A ჯგუფის იზოლატები ფართოდ არის გავრცელებული მთელ მსოფლიოში, მაშინ, როდესაც B და C ჯგუფები გვხვდება მხოლოდ შეზღუდული მასშტაბის სივრცეში. მოლეკულური საათის მოდელი, რომელიც დაფუძნებულია გენომის სინონიმურ მუტაციებზე, მიგვითითებს A ჯგუფის მასიურ დასხივებაზე შუა ჰოლოცენის ეპოქაში (უკანასკნელ 3,064–6,127 წლებში ჩვენს დრომდე). უფრო თანამედროვე მასშტაბით, *B. anthracis*-ის გლობალური პოპულაციის სტრუქტურა ასახავს კოლონიალურ ერაში სპეციფიკური გენოტიპების იმპორტირებას ძველი მსოფლიოდან ახალში, ისევე, როგორც სხვადასხვა გენოტიპის განმეორებად ინდუსტრიულ იმპორტს განვითარებულ ქვეყნებში სპორებით დაბინძურებული ცხოველური პროდუქტების მეშვეობით. ეს აღმოჩენები გვიჩვენებს, რომ ადამიანებმა მნიშვნელოვანი როლი შეასრულეს ჯილეხის ევოლუციაში, ამ ახლა უკვე გლობალური დაავადების პროლიფერაციისა და გავრცელების თვალსაზრისით.



სურათი 7. canSNP ტიპირების შედეგებზე დაყრდნობით აგებული *B. anthracis* გლობალური ფილოგენეტიკური ხე



სურათი 8. დენდროგრამა ასახავს მსოფლიოში გავრცელებული 1,033 *B. anthracis* შტამის MLVA-15 და SNP ტიპირების შედეგად მიღებულ გენოტიპებს

3 კვლევის მასალა და მეთოდები

აღნიშნული სადისერტაციო ნაშრომის ფარგლებში შესწავლილია *B. anthracis* 272 შტამი, რომელიც ინახება საქართველოს შრომის, ჯანმრთელობის და სოციალური დაცვის სამინისტროს ლ. საყვარელიძის სახელობის დაავადებათა კონტროლის და საზოგადოებრივი ჯანმრთელობის ეროვნული ცენტრის ბაქტერიების და ვირუსების ეროვნულ მუზეუმში; კვლევაში გამოყენებული *B. anthracis* იზოლატები გამოყოფილია 1990 - 2011 წლებში სხვადასხვა წყაროებიდან: ადამიანი, მსხვილფეხა და წვრილფეხა რქოსანი პირუტყვი, ნიადაგი და გარემო - რაც გულისხმობს სხვადასხვა მასალას საქონლის დაკვლის / გატყავების / დამარხვის ადგილებიდან, ჩამონარეცხს სხვადასხვა ზედაპირებიდან, მატყლს და ა.შ. (დანართი 1).

გამომდინარე იქიდან, რომ *B. anthracis* განსაკუთრებით საშიში პათოგენების ჯგუფს მიეკუთვნება, მასთან მუშაობისას ბიოუსაფრთხოების კუთხით გარკვეული სპეციფიკური სამუშაო პროცედურების დაცვა იყო საჭირო. სამუშაოები, კვლევის სხვადასხვა ეტაპზე მიმდინარეობდა ბიოუსაფრთხოების მესამე და მეორე დონის (BSL-3; BSL-2+) ლაბორატორიებში, სპეციალური პირადი აღჭურვილობით (PPE), ჯანმრთელობის მსოფლიო ორგანიზაციის (WHO) და აშშ საფრთხის შემცირების სააგენტოს (DTRA) მიერ მოწოდებული და დკსჯეც მიერ მოდიფიცირებული / ლაბორატორიებზე მორგებული და დამტკიცებული სტანდარტული საოპერაციო პროცედურების (სსპ) მიხედვით.

3.1 შტამების ბაქტერიოლოგიური მომზადება

ცენტრის ეროვნულ საცავში *B. anthracis* შტამები ინახება -80°C-ზე საყინულეში 25% გლიცეროლის ხსნარში; აღნიშნული სადისერტაციო ნაშრომის ფარგლებში ჩასატარებელი ლაბორატორიული კვლევის მიზნით ხდებოდა საცავიდან ჯილეხის კულტურების ე.წ. გამოწერა, რაც გულისხმობს მათ ხელახალ „გაცოცხლებას“ - გლიცერინიანი ხსნარიდან შესაბამის საკვებ არეზე გაზრდას და სპოროვანიდან ვეგეტატიურ ფორმაში დაბრუნებას. ამისათვის, ხდებოდა თითოეული შტამის გათესვა 5% ცხვრის სისხლიან აგარზე (SBA) და მათი თერმოსტატში ინკუბაცია 37°C-ზე.

მომდევნო დღეს, ხდებოდა ფინჯნების ვიზუალური დათვალიერება და ნაზარდის არსებობის შემთხვევაში ბაქტერიოლოგიურ ლაბორატორიისთვის გადაცემა სადაც, ფინჯნის დათვალიერების შემდგომ ირჩეოდა ერთი იზოლირებული *B. anthracis* კოლონია და ხდებოდა უკვე სუფთა, ცალკეული კოლონიის ხელახალი გადათესვა 5% ცხვრის სისხლიან აგარზე; ნათესები კვლავ თავსდებოდა მომდევნო დღემდე თერმოსტატში 37°C-ზე მაქსიმუმ 16 საათის განმავლობაში ბაცილების სპოროვან ფორმაში გადასვლის თავის არიდების მიზნით; საბოლოოდ, ყოველი შტამის შესაბამისი ფინჯანი ერთი სუფთა კოლონიიდან მიღებული ნაზარდით გადაეცემოდა მოლეკულური ეპიდემიოლოგიის ლაბორატორიას შემდგომი კვლევებისთვის.

3.2 დნმ-ის ექსტრაქცია

დნმ-ის ექსტრაქცია *B. anthracis* სუფთა ბაქტერიული კულტურებიდან დუდილის მეთოდის გამოყენებით BSL-3 ლაბორატორიაში მიმდინარეობდა; დუდილის მეთოდი გვამლევს საშუალებას მივიღოთ საკმარისი სიწმინდისა და კონცენტრაციის დნმ, რომლის გამოყენება შესაძლებელია კლასიკური ან/და რეალურ დროში პჯრ კვლევისთვის. პროცედურა ტარდებოდა დკსჯეც-სი დამტკიცებული სსპ-ის მიხედვით:

- სტერილური ერთჯერადი ჩასათესი მარყუჟის გამოყენებით კულტურის ფინჯნიდან ხდებოდა 1–2 ბაქტერიული კოლონიის აღება და 500 მკლ TE ბუფერში გახსნა;
- ნარევის ვორტექსის საშუალებით 15 წამის განმავლობაში შენჯღრევის და წვეთების ჩამოყრის მიზნით ხანმოკლე ცენტრიფუგირების შემდეგ ხდებოდა მისი ინკუბაცია 95°C-ზე 25 წუთის განმავლობაში;
- ინკუბაციის შემდგომ ნიმუშების ცენტრიფუგირება ხდებოდა 14000 ბრ/წთ 5 წუთის განმავლობაში;
- ცენტრიფუგირების დასრულებისთანავე, სინჯარებიდან ხდებოდა 400 მკლ სუპერნატანტის გადატანა ახალ 1.5 მლ მიკრო ცენტრიფუგის სინჯარებში;
- თითოეულ მიღებულ დნმ ნიმუშზე ტარდებოდა სტერილობის ტესტი არსებული სსპ-ის მიხედვით: ხსნარის 5% ეწვეთებოდა ცხვრის სისხლიან აგარზე და

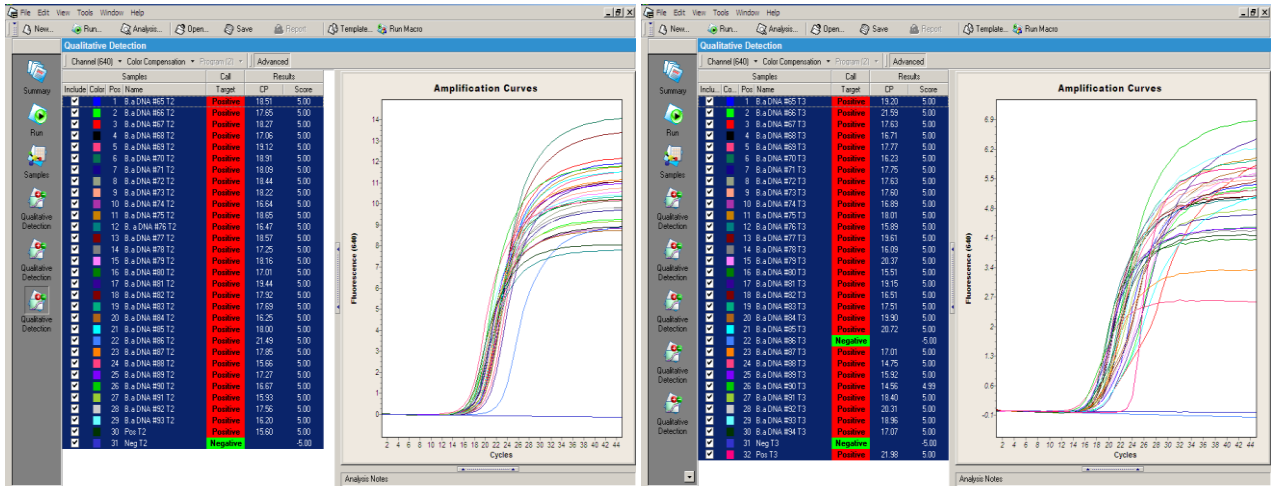
ინკუბირდებოდა 37°C-ზე 72 სთ-ის განმავლობაში. მიკრობული კოლონიების წარმოქმნის შემთხვევაში დნმ იფილტრებოდა 0.22 მკმ ფილტრში ან ინაქტივირდებოდა 95°C-ზე გაცხელებით 15-20 წთ-ის განმავლობაში, რის შემდეგაც განმეორებით მოწმდებოდა სტერილობაზე.

3.3 პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია (პჯრ) რეალურ დროში – real-time PCR

B. anthracis კულტურებიდან გამოყოფილი დნმ-ის საბოლოო დადასტურება ხდებოდა რეალურ დროში პჯრ მეთოდის გამოყენებით; ამისათვის გამოიყენებოდა ჰიბრიდიზაციული ფლუორესცენტული ზონდების პრინციპზე შემუშავებული *B. anthracis* სადიაგნოსტიკო ნაკრები (*B. anthracis* DetectionKit Target1, Target 2, Freeze-Dried Reagents, BioFire Defense, LLC), რომლის საშუალებითაც ხდებოდა საკვლევ დნმ ნიმუშში ჯილეხის ვირულენტობის განმსაზღვრელი პლაზმიდების აღმოჩენა (pXO1; pXO2); პჯრ ნაკრებში შედიოდა სინჯარები, რომლებშიც მოთავსებული იყო წინასწარ გამზადებული, ლიოფილიზირებული სარეაქციო არეები ყველა საჭირო კომპონენტით (Mg²⁺-ის იონები, Taq-პოლიმერაზა, სპეციფიკური უბნის პრაიმერები და ფლუორესცენტული საღებავით მონიშნულ ზონდი); აღნიშნულ სინჯარებს ემატებოდა 10 მკლ დნმ და 30 მკლ წყალი; ჯამში 40 მკლ ნარევი თანაბრად ნაწილდებოდა ორ-ორ კაპილარში (20-20 მკლ) და დუბლიკატების სახით იდგმებოდა კაპილარულ ამპლიფიკატორში Light Cycler 2.0, Roche შემდეგი სარეაქციო პირობებით:

✓	საწყისი დენატურაცია	94°C	2 წთ	} 45 ციკლი
✓	დენატურაცია	94°C	1 წმ	
✓	ამპლიფიკაცია	60°C	20 წმ	

დნმ ამპლიფიკაციის მრუდების ვიზუალიზაცია ხდებოდა რეაქციის მსვლელობის პარალელურად, ხოლო მონაცემთა საბოლოო ინტერპრეტაცია და შედეგების ანალიზი ხდებოდა რეაქციის დასრულების შემდეგ (სურათი 9).



სურათი 9. *B. anthracis* დამადასტურებელი real-time PCR ამპლიფიკაციის მრუდები

3.4 ერთ-ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმი (Single Nucleotide Polymorphism - SNP)

იმისათვის, რომ 272 ქართული *B. anthracis* იზოლატი გენეტიკურად დაგვეხასიათებინა და განგვეთავსებინა გლობალურ ფილოგენეტიკურ ხეზე (Pearson T, et al, 2004; Price EP, et al, 2012), ჩავატარეთ ყველა მათგანის SNP გენოტიპირება პუბლიკაციაში (ან ჩრდილო არიზონის უნივერსიტეტის პუბლიკაციაში) აღწერილი კანონიკური SNP (canSNP) მეთოდის მიხედვით (Van Ert, et al, 2007). მიღებული შედეგის თანახმად ყველა იზოლატი მიეკუთვნა Aust94 გენეტიკურ ჯგუფს (Birdsell DN, et al, 2012). იმისათვის, რომ ქართულ გენეტიკურ ჯგუფში იზოლატებს შორის სხვაობა უფრო მაღალი გარჩევადობით გამოგვევლინა, ჩვენ დამატებით ჩავატარეთ *B. anthracis* Aust94 ჯგუფის 225 იზოლატის გენოტიპირება, რომლებშიც შედიოდა როგორც ქართული, ისე ჩრდილო არიზონის უნივერსიტეტის (NAU) კოლექციაში არსებული მსოფლიოს სხვადასხვა ქვეყანაში გამოყოფილი საკოლექციო შტამები. გენოტიპირება ჩატარდა როგორც, ადრე აღწერილი Aust94 SNP ანალიზის (Birdsell DN, et al, 2012), ასევე ამ კვლევის ფარგლებში შემუშავებული პრაიმერების მეშვეობით (იხ. ქვევით - CanSNP სელექცია და ანალიზი). ამ მიზნის მისაღწევად საჭირო იყო რამოდენიმე ქართული შტამის სრული გენომის სექვენირება.

3.4.1 სრული გენომის სექვენირება Aust94 ჯგუფის შესწავლის მიზნით

ქართულ Aust94 ჯგუფში გენეტიკური სტრუქტურის შემდგომი განსაზღვრის მიზნით, ჩრდილო არიზონის უნივერსიტეტთან კოლაბორაციის ფარგლებში ჩატარდა Aust94 გენეტიკური ჯგუფის სამი ქართული იზოლატის (52-G, 9080-G და 8903-G) სრული გენომის სექვენირება Illumina Genome Analyzer II პლატფორმაზე (San Diego, CA). ამ იზოლატებისათვის დნმ ბიბლიოთეკის მომზადება მოიცავდა სტანდარტული, ქლოროფორმით ექსტრაქციის პროტოკოლით (*Sambrook J, et al, 1989*) მიღებული 5 მგ გენომური დნმ-ის დამუშავებას ულტრაბერით, რის შედეგადაც ხდებოდა მისი დაჭრა საშუალო ზომის 350 bp ფრაგმენტებად. დნმ-ის რაოდენობრივი განსაზღვრა ხდებოდა SYBR-დაფუძნებული რაოდენობრივი პჯრ (qPCR) რეაქციის მეშვეობით. დაწყვილებული თანმიმდევრობების სიგრძე, რომელთა წაკითხვა ორივე მიმართულებით ხდებოდა, იყო 100 bp. 52-G, 9080-G და 8903-G შტამების სექვენირებული თანმიმდევრობები ატვირთულ იქნა GenBank მონაცემთა ბაზაში (PRJNA224563, PRJNA224558 და PRJNA224562) (*Khmaladze E, et al, 2014*).

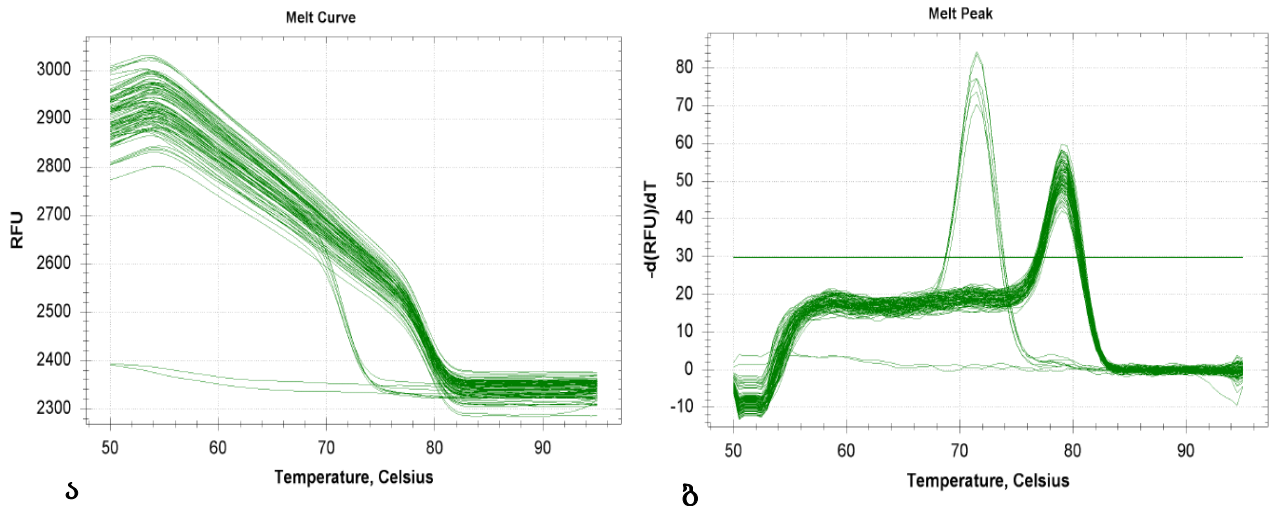
3.4.2 ქართული შტამებისთვის სპეციფიკური CanSNP სელექცია და ანალიზი

სავარაუდო SNP-ების იდენტიფიცირების მიზნით გამოყენებული იყო კომპიუტერული პროგრამა MUMmer. პირველ რიგში განისაზღვრებოდა ჰომოლოგიური გენომური უბნები (*Kurtz S, et al, 2004*); შემდეგ, SNP შესარჩევად ხდებოდა საკვლევი თანმიმდევრობებისა და რეფერენსული შტამის ურთიერთგანლაგება პროგრამის SolSNP (<http://sourceforge.net/projects/solsnp/>) მეშვეობით. SNP სელექციის მიზნით გათვალისწინებული იყო რამოდენიმე პარამეტრი: კერძოდ, საჭირო იყო პოტენციური პარალოგების (განმეორებადი გენომური უბნების) ელიმინაცია; ასევე, ყველა SNP შორის მინიმალური დაშორება უნდა ყოფილიყო 100 bp; და გარდა ამისა, აუცილებელი იყო შერჩეული SNP ლოკუსის არსებობა ყველა გამოკვლეულ გენომში. შერჩეული SNP-ის

ვალიდაციისათვის აიგო მაქსიმალურად შემჭიდროებული ხე (maximum-parsimony tree) PAUP 4.0b10 პროგრამის მეშვეობით.

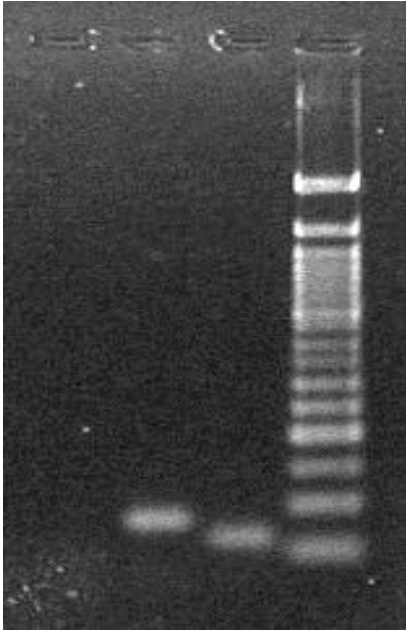
სრული გენომური თანმიმდევრობების (Whole Genome Sequence (WGS)) შედარებებმა ქართულ (52-G) და დანარჩენ Aust94 (Aust94, AAES00000000) შტამებს შორის გამოავლინა 52-G შტამისათვის სპეციფიკური 50 სავარაუდო SNP. ზემოთ აღწერილი SNP შერჩევის კრიტერიუმების გათვალისწინებით შეირჩა 26 SNP და მოხდა შესაბამისი SNP პრაიმერების დიზაინი. თითოეული ტესტისთვის ალელ-სპეციფიკური პრაიმერების შემუშავება ხდებოდა Primer Express 3.0 პროგრამის მეშვეობით (Applied Biosystems, Foster City, CA);

საბოლოოდ, შემუშავდა SNP გენოტიპირების ტესტები, რომლებიც დიზაინირებული იყო როგორც SYBR Green პლატფორმაზე დამყარებული real-time PCR ანუ ე.წ. melt-MAMA (Mismatch Amplification Mutation Assay) (Birdsell DN, et al, 2012), ანალიზისათვის, ასევე გელ-ელექტოფორეზით მიმდინარე PCR რეაქციისათვისაც. melt-MAMA მეთოდი ეყრდნობოდა SNP ალელების სპეციფიკური ორი ფორვარდ პრაიმერის კონკურენტულ ამპლიფიკაციას, რომლებსაც SNP პოზიციის წინ ხელოვნურად არასწორი ნუკლეოტიდი ჰქონდათ დამატებული, ხოლო ერთერთ ფორვარდ პრაიმერზე დამატებით 20-ნუკლეოტიდიანი GC კუდი იყო მიმაგრებული. PCR რეაქცია მიმდინარეობდა შემდეგი პირობებით: 95°C 10 წუთის განმავლობაში, დნმ-ის დენატურაციის მიზნით; ამას მოჰყვებოდა 33 ციკლი შემდეგი პირობებით: 95°C – 15 წმ და 55°C / 60°C - 1 წთ; PCR ციკლის დასრულებისთანავე ამპლიკონის ლღობის ტემპერატურა განისაზღვრებოდა წელი (0.2°C/წთ) გაცხელებით 60°C-დან 95°C-მდე და ფლუორესცენტული აქტივობის უწყვეტი გაზომვით. Real-Time PCR რეაქციებისათვის გამოიყენებოდა BioRad CFX96 Real-Time აპარატი. ლღობის დისოციაციის პრინციპი გულისხმობს გარკვეულ ტემპერატურაზე ამპლიკონების დნმ-ის ორჯაჭვიანი სტრუქტურის დაშლას და სინჯარაში SYBR Green-ის ფლუორესცენტული ნათების შეწყვეტას. დისოციაციის მრუდების პროგრამული დამუშავების შედეგად მიიღებოდა ლღობის ტემპერატურული პიკები (სურათი 10 ა და ბ). შესაბამისად, ის ფორვარდ პრაიმერი, რომელსაც GC კუდი ჰქონდა მიმაგრებული უფრო მაღალი ლღობის ტემპერატურით ხასიათდებოდა, ვიდრე მეორე ფორვარდ პრაიმერი GC კუდის გარეშე.



სურათი 10. ა. ლღობის მრუდი; ბ. ლღობის პიკი (BioRad CFX96 Real-Time Detection System)

გელ-ელექტროფორეზის შემთხვევაში 2.5%-იანი აგაროზის გელი იდგმებოდა ჰორიზონტალური ელექტროფორეზის აპარატში, სადაც წინასწარ იყო მოთვსებული TBE (Tris 130 mM; EDTA 2.5 mM; ბორის მჟავა 45 mM) ბუფერი. ელექტროფორეზი 2,5 საათის განმავლობაში მიმდინარეობდა 100 ვოლტი ძაბვის პირობებში. გელის შეღებვა ხდებოდა ეთიდიუმ ბრომიდის ხსნარში (100 მგ/ლ), ხოლო შედეგების ვიზუალიზაციისათვის ტრანსილუმინატორის ულტრაიისფერი გამოსხივება გამოიყენებოდა. შედეგები ვიზუალიზაცია და დაფიქსირება ხდებოდა პოლაროიდისა და ციფრული კამერების მეშვეობით. შედეგად, პირველადი SNP ალელი 20 ნუკლეოტიდით უფრო პატარა ფრაგმენტს იძლეოდა შეცვლილი SNP ალელის მქონე შტამთან შედარებით (სურათი 11).



სურათი 11. სხვადასხვა SNP ალელების (Der & Anc) განსხვავებული ზომების გელით ვიზუალიზაცია

შემუშავებული პრაიმერების ვალიდაციის მიზნით სარეაქციო არეში ფორვარდ პრაიმერები GC კუდით და კუდის გარეშე ემატებოდა სხვადასხვა კონცენტრაციით (1:1; 1:3 და 1:6) და ცალცალკე, ხოლო რევერს პრაიმერის რაოდენობა და PCR რეაქციის ყველა სხვა კომპონენტი უცვლელი რჩებოდა. ვალიდაციის შედეგად ყველა პრაიმერისთვის შერჩეული იყო ოპტიმალური კონცენტრაცია;

პჯრ რეაქციის ხარისხის და ამპლიფიკაციის მრუდების ვიზუალური შეფასების შედეგად, საბოლოოდ შეირჩა თითოეული გენეტიკური ჯგუფის განმსაზღვრელი რვა, ქართული იზოლატებისთვის სპეციფიკური კანონიკური SNP ტესტი (ცხრილი 1).

ცხრილი 1. Melt-MAMA და გელ-ელექტროფორეზით ანალიზისათვის შერჩეული კანონიკური SNP პრაიმერები

SNP ქვეჯგუფი	პოზიცია AmesA გენომში	SNP ნუკლ. (Der/Anc)	Melt MAMA პრაიმერი	Melt-MAMA პრაიმერის თანმიმდევრობები	პრაიმერის კონც. (μM)	პრაიმერის დაკავშირების ტემპ. (°C)	ლლობის ტემპ. T _m (°C)
A. Br 026	3640599	T/C	Der	cggggcggggcggggcggggCTTCTTTTAATACATCTAAGTAAGTAAGCGTTcT	0,15	60	71,4
			Anc	CTTCTTTTAATACATCTAAGTAAGTAAGCGTTgC	0,45		78,5
			Con	ATTGACCCAACAGCTACGAAATAC	0,15		
A. Br 027	4355524	A/G	Der	cggggcggggcggggcggggCCCATTCCAAGTGACACACTgA	0,15	60	82,2
			Anc	CCCATTCCAAGTGACACACTcG	0,60		74,2
			Con	AGCACTTGCTTATCTTGGAGCTT	0,15		
A. Br 028	791256	A/G	Der	cggggcggggcggggcggggACAGAGAAGGTTATAAGTCCAGAAgA	0,15	60	79
			Anc	ACAGAGAAGGTTATAAGTCCAGAcGG	0,15		73
			Con	CTCGCTTTTCTGTTCCTTTTATTGAC	0,15		
A. Br 029	3960657	A/G	Der	ggggcggggcggggcggggcggggAGTATTCCAACCATTACTATAGTCACTcA	0,15	60	79,4
			Anc	AGTATTCCAACCATTACTATAGTCACTaG	0,15		71,5
			Con	GTACTTATTGGTGGTACTGCCAAATT	0,15		
A. Br 030	3528668	A/G	Der	ggggcggggcggggcggggcggggCAATCCCTCGATTACATATAAAATATAAcA	0,15	60	75,4
			Anc	CAATCCCTCGATTACATATAAAATATAAaG	0,15		69,2
			Con	AGGTATGTATGAATTAGAAGGGAAGAA	0,15		
A. Br 031	3018054	C/T	Der	cggggcggggcggggcggggACTATCGCCAAAAGCAATTGtAC	0,15	55	77,5
			Anc	ACTATCGCCAAAAGCAATTGaT	0,15		69
			Con	TATTTTAGACAAGTACGAACACTAGATAAATCAA	0,15		
A. Br 032	3520170	G/A	Der	cggggcggggcggggcggggCCACCAACAACGAATGGAAGaG	0,15	60	80
			Anc	CCACCAACAACGAATGGAAGtA	0,45		70,2
			Con	AGCATTTAATGAACGCGTAAAGTAATA	0,15		
A. Br 033	3610151	C/T	Der	ggggcggggcggggcggggcggggCTAAATAACCAAGGCGTCTTGcTAC	0,15	60	81,60
			Anc	TAAATAACCAAGGCGTCTTGCCAT	0,60		72,8
			Con	TGTAGGACGTAGTATGGTAAAAGTAGTAGAT	0,15		

3.5 მრავლობითი ლოკუსების ტანდემურად განმეორებადი თანმიმდევრობების ცვლადი რაოდენობის ანალიზი – MLVA

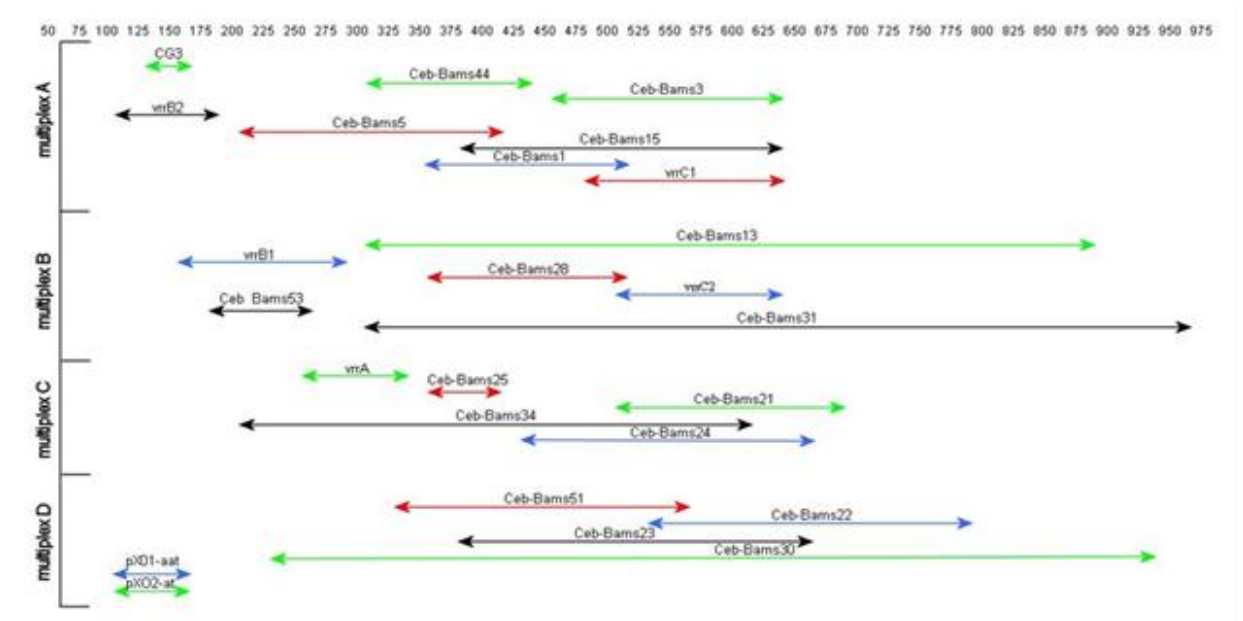
ქართულ *B. anthracis* გენეტიკურ ჯგუფებში კიდევ უფრო მეტი მრავალფეროვნების შესწავლის მიზნით, ზემოთ აღწერილი 8 SNP ქვეჯგუფიდან MLVA-25 კვლევისათვის შეირჩა საქართველოში იზოლირებული 30 *B. anthracis* იზოლატი. კვლევაში გამოყენებული იყო 25 მარკერიანი VNTR ლოკუსების სისტემა (ე.წ. *B. anthracis* MLVA-25) (Lista F, et al, 2006) რომელიც ადაპტირდა ხუთი ფლორესცენტული საღებავის აღქმის უნარის მქონე პლატფორმაზე 3100xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems (ცხრილი 2).

ცხრილი 2. MLVA-25 კვლევაში გამოყენებული პრაიმერების ჩამონათვალი

#	პრაიმერის დასახელება	პრაიმერის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობა
1	Ceb-Bams 1F-FAM	GTTGAGCATGAGAGGTACCTTGTCTTTTT
2	Ceb-Bams 1R	AGTTCAAGCGCCAGAAGGTTATGAGTTATC
3	Ceb-Bams 3F-VIC	GCAGCAACAGAAAACCTTCTCTCCAATAACA
4	Ceb-Bams 3R	TCCTCCCTGAGAAGCTGCTATCACCTTTAAC
5	Ceb-Bams 5F-PET	GCAGGAAGAACAAGAACTAGAAAGAGCA
6	Ceb-Bams 5R	ATTATTAGCAGGGGCTCTCTGCATTACC
7	Ceb-Bams 13F-VIC	AATTGAGAAATTGCTGTACCAAACCT
8	Ceb-Bams 13R	CTAGTGCATTTGACCCTAATCTTGT
9	Ceb-Bams 15F-NED	GTATTTCCCCCAGATACAGTAATCC
10	Ceb-Bams 15R	GTGTACATGTTGATTCATGCTGTTT
11	Ceb-Bams 21F-VIC	TGTAGTGCCAGATTTGTCTTCTGTA
12	Ceb-Bams 21R	CAAATTTTGAGATGGGAGTTTACT
13	Ceb-Bams 22F-FAM	ATCAAAAATTCTTGGCAGACTGA
14	Ceb-Bams 22R	ACCGTTAATTCACGTTTAGCAGA
15	Ceb-Bams 23F-NED	CGGTCTGTCTCTATTATTCAGTGGT
16	Ceb-Bams 23R	CCTGTTGCTCCTAGTGATTTCTTAC
17	Ceb-Bams 24F-FAM	CTTCTACTTCCGTAAGTTGAAATTGG
18	Ceb-Bams 24R	CGTCACGTACCATTTAATGTTGTTA
19	Ceb-Bams 25F-PET	CCGAATACGTAAGAAATAAATCCAC
20	Ceb-Bams 25R	TGAAAGATCTTGAAAAACAAGCATT
21	Ceb-Bams 28F-PET	CTCTGTTGTAACAAAATTTCCGTCT
22	Ceb-Bams 28R	TATTAACCAGGCGTTACTTACAGC
23	Ceb-Bams 30F-VIC	AGCTAATCACCTACAACACCTGGTA
24	Ceb-Bams 30R	CAGAAAATATTGGACCTACCTTCC
25	Ceb-Bams 31F-NED	GCTGTATTTATCGAGCTTCAAATCT
26	Ceb-Bams 31R	GGAGTACTGTTTGTGAAATGTTGTTT
27	Ceb-Bams 34F-NED	CAGCAAAATCAATCGAATCAA
28	Ceb-Bams 34R	TGTGCTAAATCATCTTGCTTGG
29	Ceb-Bams 44F-VIC	GCGAATTAATTGCTCCTCAAAT
30	Ceb-Bams 44R	GCACTTGAATATTTGGCGGTAT
31	Ceb-Bams 51F-PET	ATTTCTGAAGCAGGTTGTGTT
32	Ceb-Bams 51R	TGCATCTAACAATGCAGAACAA
33	Ceb-Bams 53F-NED	GAGGTGTGTTAGGTGGGCTTAC
34	Ceb-Bams 53R	CATATTTTACCTTAATTTTGGGAAG
35	<i>virA</i> -F-VIC	CAC AAC TAC CAC CGA TGG CAC A
36	<i>virA</i> -R	GCG CGT TTC GTT TGA TTC ATA C
37	<i>virB1</i> -F-FAM	ATA GGT GGT TTT CCG CAA GTT ATT C

38	<i>vrrB1</i> -R	GAT GAG TTT GAT AAA GAA TAG CCT GTG
39	<i>vrrB2</i> -F-NED	CAC AGG CTA TTC TTT ATC AAA CTC ATC
40	<i>vrrB2</i> -R	CCC AAG GTG AAG ATT GTT GTT GA
41	<i>vrrC1</i> -F	GAA GCA AGA AAG TGA TGT AGT GGA C
42	<i>vrrC1</i> -R-PET	CAT TTC CTC AAG TGC TAC AGG TTC
43	<i>vrrC2</i> -F-FAM	CCA GAA GAA GTG GAA CCT GTA GCA C
44	<i>vrrC2</i> -R	GTC TTT CCA TTA ATC GCG CTC TAT C
45	CG3-F-VIC	TGT CGT TTT ACT TCT CTC TCC AAT AC
46	CG3-R	AGT CAT TGT TCT GTA TAA AGG GCA T
47	pXO1-AAT-F-FAM	CAA TTT ATT AAC GAT CAG ATT AAG TTC A
48	pXO1-AAT-R	TCT AGA ATT AGT TGC TTC ATA ATG GC
49	pXO2-AT-F-VIC	TCA TCC TCT TTT AAG TCT TGG GT
30	pXO2-AT-R	GTG TGA TGA ACT CCG ACG ACA

25 VNTR ლოკუსის შესაბამისი პრაიმერები (Forward & Reverse) გაერთიანებული იყო 4 მულტიპლექსურ სარეაქციო ნარევიში (Multiplex A; Multiplex B; Multiplex C; Multiplex D) (ცხრილი 3) (სურათი 12).



სურათი 12. MLVA-25 პრაიმერების დიზაინი და ფლუორესცენტული საღებავებით მონიშვნის სქემა. ისრებით ნაჩვენებია VNTR-ის ზომის დიაპაზონი. ისრის ფერი მიუთითებს ფლუორესცენტული

საღებავის ფერს რომლითაც მონიშნულია VNTR (მწვანე = VIC™; ლურჯი = FAM; შავი = NED™; წითელი = PET™).

ცხრილი 3. MLVA-25 PCR სარეაქციო ნარევის მომზადების ცხრილი (ნარევი A, B, C და D)

ნარევი A / Multiplex A			
რეაგენტო	15 ul/well		მოგ. 1 რეაქციაზე
	საწყ. კონც.	საბ. კონც.	
H2O			7,55 µl
საკვლევი დნმ			1,00 µl
10X PCR სარეაქციო არე	10 X	1 X	1,50 µl
Cg3_ F&R	5 µM	0,033 µM	0,10 µl
bams44_ F&R	10 µM	0,133 µM	0,20 µl
bams3_ F&R	10 µM	0,333 µM	0,50 µl
vrB2_ F&R	5 µM	0,033 µM	0,10 µl
bams5_ F&R	10 µM	0,1 µM	0,15 µl
bams15_ F&R	10 µM	0,333 µM	0,50 µl
bams1_ F&R	10 µM	0,2 µM	0,30 µl
vrC1_ F&R	10 µM	0,267 µM	0,40 µl
MgCl2	50 mM	5 mM	1,50 µl
DNTP ნარევი (2.5mM)	2,5 mM ea	0,167 mM ea	1,00 µl
platTaq დნმ პოლიმერაზა (5U/ul)	5 U/ul	0,5 U/rxn	0,20 µl
საბ. რეაქციის მოგ.			15,00 µl

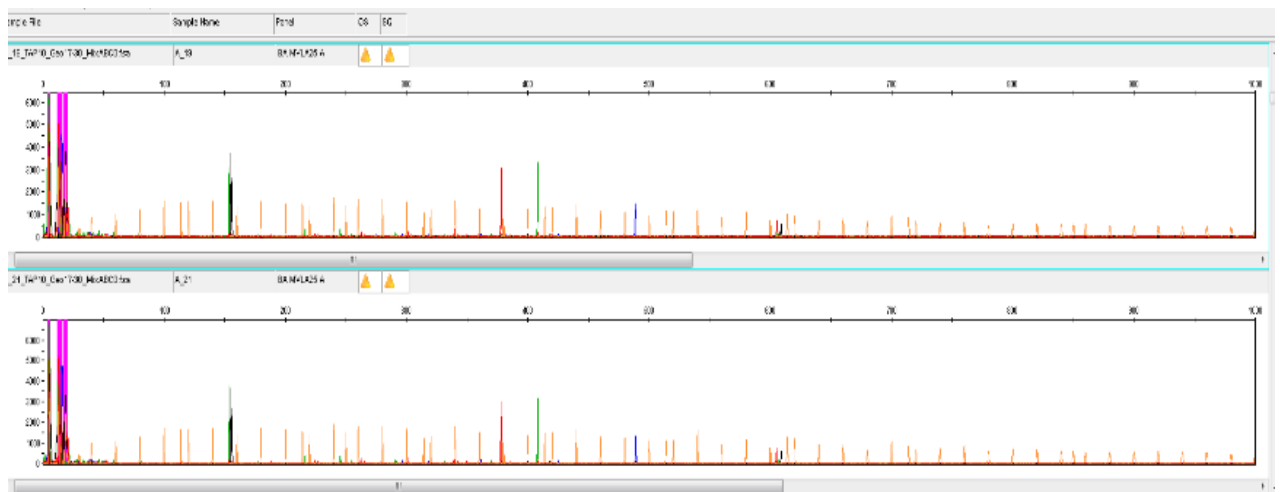
ნარევი C / Multiplex C			
რეაგენტო	15 ul/well		მოგ. 1 რეაქციაზე
	საწყ. კონც.	საბ. კონც.	
H2O			8,10 µl
საკვლევი დნმ			1,00 µl
10X PCR სარეაქციო არე	10 X	1 X	1,50 µl
vrA_ F&R	5 µM	0,033 µM	0,10 µl
bams25_ F&R	10 µM	0,1 µM	0,15 µl
bams21_ F&R	10 µM	0,4 µM	0,60 µl
bams34_ F&R	10 µM	0,167 µM	0,25 µl
bams24_ F&R	10 µM	0,4 µM	0,60 µl
MgCl2	50 mM	5 mM	1,50 µl
DNTP ნარევი (2.5mM)	2,5 mM ea	0,167 mM ea	1,00 µl
platTaq დნმ პოლიმერაზა (5U/ul)	5 U/ul	0,5 U/rxn	0,20 µl
საბ. რეაქციის მოგ.			15,00 µl

ნარევი B / Multiplex B			
რეაგენტო	15 ul/well		მოგ. 1 რეაქციაზე
	საწყ. კონც.	საბ. კონც.	
H2O			7,55 µl
საკვლევი დნმ			1,00 µl
10X PCR სარეაქციო არე	10 X	1 X	1,50 µl
bam13_ F&R	10 µM	0,2 µM	0,30 µl
vrB1_ F&R	5 µM	0,067 µM	0,20 µl
bams28_ F&R	10 µM	0,3 µM	0,45 µl
vrC2_ F&R	5 µM	0,117 µM	0,35 µl
bams53_ F&R	10 µM	0,233 µM	0,35 µl
bams31_ F&R	10 µM	0,4 µM	0,60 µl
MgCl2	50 mM	5 mM	1,50 µl
DNTP ნარევი (2.5mM)	2,5 mM ea	0,167 mM ea	1,00 µl
platTaq დნმ პოლიმერაზა (5U/ul)	5 U/ul	0,5 U/rxn	0,20 µl
საბ. რეაქციის მოგ.			15,00 µl

ნარევი D / Multiplex D			
რეაგენტო	15 ul/well		მოგ. 1 რეაქციაზე
	საწყ. კონც.	საბ. კონც.	
H2O			6,95 µl
საკვლევი დნმ			1,00 µl
10X PCR სარეაქციო არე	10 X	1 X	1,50 µl
bams51_ F&R	10 µM	0,4 µM	0,60 µl
bams22_ F&R	10 µM	0,333 µM	0,50 µl
bams23_ F&R	10 µM	0,333 µM	0,50 µl
bams30_ F&R	10 µM	0,6 µM	0,90 µl
pX01_ F&R	5 µM	0,05 µM	0,15 µl
pX02_ F&R	5 µM	0,067 µM	0,20 µl
MgCl2	50 mM	5 mM	1,50 µl
DNTP ნარევი (2.5mM)	2,5 mM ea	0,167 mM ea	1,00 µl
platTaq დნმ პოლიმერაზა (5U/ul)	5 U/ul	0,5 U/rxn	0,20 µl
საბ. რეაქციის მოგ.			15,00 µl

პჯრ პირობები იყო შემდეგნაირი: საწყისი დენატურაცია 95°C – 5 წთ, შემდეგ ამპლიფიკაციის 35 ციკლი პირობებით: 95°C – 30 წმ, 55°C – 30 წმ და 72°C – 60 წმ; რეაქცია სრულდებოდა საბოლოო ელონგაციით 72°C – 5 წთ. ამპლიფიკაციის დასრულების შემდეგ, მიღებული პროდუქტები ზავდებოდა პროპორციით 1:100 (2 მკლ ამპლიფიცირებულ პროდუქტს ემატებოდა 198 მკლ წყალი) პარალელურად, მზადდებოდა დენატურაციის ბუფერისა (18.7 მკლ Hi-Di ფორმამიდი) და ფლუორესცენტული ზომის სტანდარტის (0.3 მკლ 1200 LIZ Size Standard) ნარევი; 96-ფოსოიანი პლანშეტის თითოეულ ფოსოში ემატებოდა ფორმამიდისა და ზომის სტანდარტის ნარევის 19 მკლ და 1 მკლ თითოეული ამპლიფიცირებული, განზავებული პჯრ პროდუქტი (საბოლოო მოცულობა 20 მკლ); გამზადებული ნიმუშების

დენატურაცია ხდებოდა 95°C-ზე 5 წთ-ის განმავლობაში თერმოციკლერში GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems; დენატურაციის შემდეგ პლანშეტი დაუყოვნებლივ თავსდებოდა ყინულზე 3-5 წთ განმავლობაში; პჯრ პროდუქტების ფრაგმენტული ანალიზი და ზომის ვიზუალიზაცია მიმდინარეობდა 16-არხიან კაპილარულ ავტომატურ სექვენატორზე (Applied Biosystems 3100xl Genetic Analyzer): თხევადი აკრილამიდის პოლიმერში ელექტროფორეზით ხდებოდა ამპლიკონების ზომების მიხედვით დაყოფა. შედეგების ანალიზისათვის გამოიყენებოდა პროგრამა GeneMapper, Applied Biosystems (სურათი 13), რომელიც ROX (carboxy-X-rhodamine) ფლუორესცენტული საღებავით მონიშნული 1200 მოლეკულური წონის LIZ სტანდარტის მიხედვით ადგენდა მიღებული ამპლიკონების ზომებს; თითოეული იზოლატისთვის, მიღებული ფრაგმენტის ზომების ნორმალიზება ხდებოდა მოსალოდნელი ზომების წინასწარ მოცემული ცხრილის მიხედვით (ცხრილი 4), ხოლო მიღებული შედეგების საბოლოო კლასტერული ანალიზი და დენდროგრამის აგება ხდებოდა პროგრამის Bionumerics v6.6, Applied Maths გამოყენებით.



სურათი 13. *B. anthracis* MLVA-25 ელექტროფეროგრამების GeneMapper-ით ვიზუალიზაცია

ცხრილი 4. *B. anthracis* MLVA-25 VNTR-ების მოსალოდნელი ზომები

VIC-5	VIC-39	VIC-15	NED-9	NED-9	FAM-21	PET-39	PET-9	FAM-9	FAM-18	VIC-39	PET-24	NED-12	NED-9	VIC-12	VIC-45	PET-15	NED-39	FAM-42	PET-45	FAM-36	FAM-9	NED-42	VIC-3	VIC-2
CG3	Bams-44	Bams-3	vrB2	Bams-15	Bams-1	Bams-5	vrC1	vrB1	vrC2	Bams-13	Bams-28	Bams-53	Bams-31	vrA	Bams-21	Bams-25	Bams-34	Bams-24	Bams-51	Bams-22	pXO-1	Bams-23	pXO-2	Bams-30
153	339	474	135	409	380	229	517	193	532	337	373	212	331	290	541	376	238	469	358	555	132	399	123	268
158	378	489	144	418	401	268	526	202	550	376	397	224	340	302	586	391	277	511	403	591	141	441	126	270
	417	504	153	427	422	307	535	211	568	415	421	236	349	314	631	406	316	553	448	627	150	483	129	272
		519	162	436	443	346	544	220	586	454	445		358	326	676		355	595	493	663		525	132	274
		534	171	445	464	385	553	229	604	493	269		367				394	637	538	699		567	135	276
		549		454	485		562	238		532	493		376				433			735		609		278
		564		463			571	247		571			385				472					651		280
		579		472			580	356		610			394				511							282
		594		481			589			649			403				550							284
		609		490			598			688			412				589							286
				499			607			727			421											288
				508			616			766			430											290
				517						805			439											292
				526						844			448											294
				535						883			457											296
				544									466											298
				553									475											300
				562									484											302
				571									493											304
				580									502											306
				589									511											308
				598									520											310
				607									529											312
				618									538											314
													547											316
													556											318
													565											320
													574											322
													583											324
													592											326
													601											328
													925											916

3.6 სრული გენომის სექვენირება (Whole Genome Sequencing - WGS)

აღნიშნული სადისერტაციო ნაშრომის ფარგლებში ჯილხის იზოლატების სრულყოფილი დახასიათების მიზნით გადაწყდა საქართველოს სხვადასხვა რეგიონში სხვადასხვა წყაროდან იზოლირებული ჯილხის ათი შტამის მთლიანი გენომის სექვენირება დკსჯეც ლუგარის სჯ კვლევით ცენტრში არსებული ახალი თაობის სექვენირების ტექნოლოგიის გამოყენებით - Illumina, MiSeq.

გარდა მანამდე დახასიათებული 272 ქართული იზოლატისა, დკსჯეც კოლექციიდან დამატებით რამდენიმდე ჯილხის შტამის SNP ტიპირებამ გამოავლინა ხუთი იზოლატი რომელიც განეკუთვნება სრულიად სხვა, ქართულებისგან გენეტიკურად შორს მდგომ კანონიკურ SNP ჯგუფს - TEA (A.Br.008). სწორედ ამიტომ, სრული გენომის სექვენირებისთვის შეირჩა ორივე კანონიკური SNP ჯგუფის წარმომადგენელი *B. anthracis* 10 იზოლატი (ცხრილი 5).

ცხრილი 5. სექვენირებული *B. anthracis* შტამები

Illumina MiSeq #	შტამის #	SNP ჯგუფი	შტამის იზოლაციის წელი	რეგიონი	შტამის იზოლაციის წყარო
S1	1802-G	AUS94 (A.br003)	2012	-	ადამიანი
S2	1897/12-G	AUS94 (A.br003)	2012	-	პირუტყვი
S4	8776-G	AUS94 (A.br003)	1992	გურჯაანი	ადამიანი
S9	9065-G	AUS94 (A.br003)	2008	წალკა	ადამიანი
S10	9108-G	AUS94 (A.br003)	2008	თბილისი	ადამიანი
S3	7673-G	TEA (A.br008)	1989	მესტია	ნიადაგი
S5	8782-G	TEA (A.br008)	1992	გურჯაანი	პირუტყვი
S6	8784-G	TEA (A.br008)	1992	თბილისი	პირუტყვი
S7	8785-G	TEA (A.br008)	1992	მცხეთა	ადამიანი
S8	8884-G	TEA (A.br008)	1994	ქარელი	ადამიანი

3.6.1 გენომური დნმ - ის ექსტრაქცია

სექვენირებისათვის შერჩეული შტამებიდან, გენომური დნმ-ის ექსტრაქცია ჩრდილო არიზონის უნივერსიტეტის მიერ მოწოდებული პროტოკოლის მიხედვით ხდებოდა

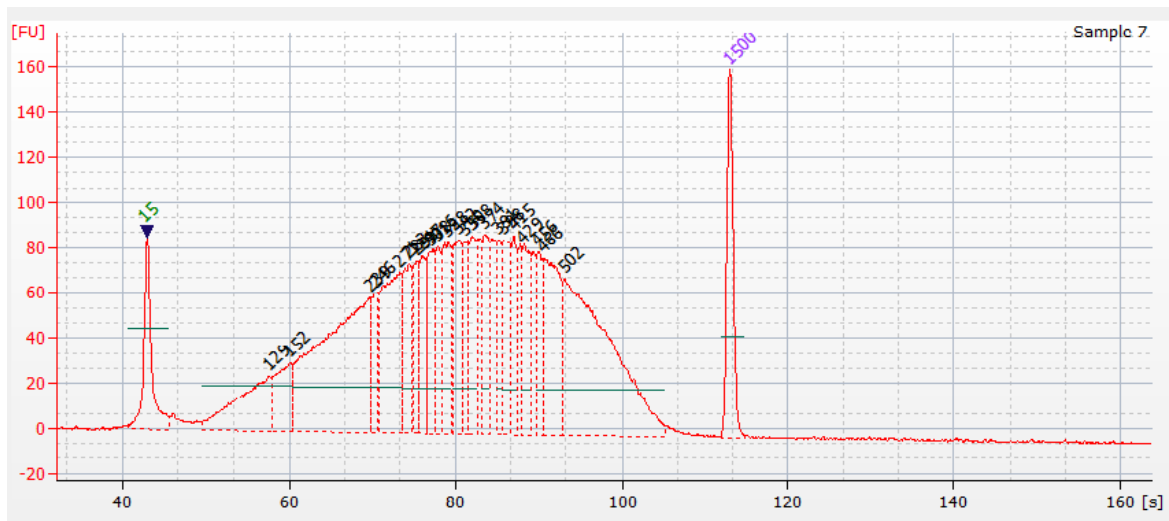
1. ერთი კოლონიიდან მიღებული 16 საათიანი კულტურა თავსდება 11 მლ TE ბუფერში, რომელსაც წინასწარ დამატებული ჰქონდა 11 მკლ RNase A (100მგ/მლ).
2. თავდაპირველად ერთგვაროვანი სუსპენზია თავსდება თხევად აზოტში 1 წთ-ით სრულ გაყინვამდე, ხოლო შემდეგ 5-10 წთ-ით 65°C წყლის აბაზანაში სრულ გამოდნობამდე; პროცედურა მეორდება 2-3-ჯერ.
3. სუსპენზიას ოთახის ტემპერატურაზე გაგრილების შემდეგ ემატებოდა 225 მკლ 20% SDS და 45 მკლ პროტეინაზა K (20 მგ/მლ); ხდება ნარევის ინკუბაცია 55°C წყლის აბაზანაში.
4. ინკუბაციის დასრულებისთანავე ნარევს ემატებოდა 2.5 მლ 5 M NaCl და 5 წთ განმავლობაში ფრთხილი მოძრაობით ხდება მისი შერევა.
5. შემდგომ ეტაპზე ნარევს ემატებოდა 1.4 მლ CTAB/NaCl (10% ჰექსა-დეცილტრიმეთილ-ამონიუმ ბრომიდი (CTAB), 0.7 M NaCl ხსნარში) და ისიც ფრთხილად ერეოდა 10 წთ განმავლობაში
6. ამის შემდეგ ხდება ნარევის 10 წთ-იანი ინკუბაცია 65°C წყლის აბაზანაში.
7. ინკუბაციის შემდეგ ნარევი 5 წთ-ით ჩერდება ოთახის ტემპერატურაზე, სწრაფად ემატებოდა 12 მლ წინასწარ მომზადებული ქლოროფორმისა და იზოამილის სპირტის (24:1) ნარევი და ნელი მოძრაობით ინჯღრეოდა 10 წთ-ის განმავლობაში
8. ხდება ნარევის ცენტრიფუგირება 4°C-ზე 10 წთ-ის განმავლობაში 4000 ბრ/წთ (3220× g) სიჩქარით
9. გამჭვირვალე ფაზა ახალ სინჯარაში გადატანის შემდეგ ისევ ემატებოდა 12 მლ ქლოროფორმ:იზოამილის (24:1) ნარევი, ერეოდა და ხდება ცენტრიფუგირება 4000 ბრ/წთ (3220× g) 4°C-ზე 10 წთ განმავლობაში
10. ზედა ფაზა იფილტრებოდა 0.22 მკმ ფილტრში და ახალ სინჯარაში გადატანის შემდეგ ემატებოდა 0.6 მოცულობა იზოპროპანოლი, კარგად ერეოდა დნმ-ის სრულ გამოლექვამდე და იდგმებოდა -20°C მაცივარში მთელი ღამით
11. მეორე დღეს ხდება სინჯარის ცენტრიფუგირება 4000 ბრ/წთ (3220× g) სიჩქარეზე 4°C-ზე 30 წთ განმავლობაში
12. სუპერნატანტის გადაღვის შემდეგ ნალექს ემატებოდა 1 მლ 70% ეთანოლი და ცენტრიფუგირდებოდა 4°C 10 წთ განმავლობაში 4000 ბრ/წთ (3220× g) სიჩქარეზე

13. სუპერნატანტის გადაღვის შემდეგ, ნალექი შრებოდა, ემატებოდა 300 მკლ სტერილური TE ბუფერი და იდგმებოდა 4°C-ზე მთელი ღამით, დნმ-ის სრულ გახსნამდე

მიღებული მაღალკონცენტრირებული გენომური დნმ მოწმდებოდა სტერილობაზე: 15 მკლ (5%) ეწვეთებოდა 5%-იან ცხვრის სისხლიან აგარს და ხდებოდა მისი ინკუბაცია 37°C-ზე 72 სთ-ით. ნაზარდის წარმოქმნის შემთხვევაში დნმ ხელმეორედ იფილტრებოდა 0.2 მკმ ფილტრში.

3.6.2 დნმ ბიბლიოთეკის მომზადება, სექვენირება და მონაცემთა ანალიზი

B. anthracis 10 იზოლატის გენომური დნმ-ის ფრაგმენტების ბიბლიოთეკის მომზადება ხდებოდა ლოს ალამოსის ნაციონალური ლაბორატორიის მიერ მოწოდებული Illumina MiSeq ახალი თაობის სექვენირების პროტოკოლის მიხედვით. კერძოდ კი *B. anthracis* დნმ ნიმუშები იხლიჩებოდა ნებულიზატორის მეშვეობით დაახლოებით 450bp. ბიონალიზატორზე (Agilent 2100 Bioanalyzer) ელექტროფორეზით ხდებოდა დაჭრილი ფრაგმენტების ხარისხის კონტროლი (სურათი 14).



სურათი 14. დაჭრილი დნმ ფრაგმენტების პიკების ზომების ვიზუალიზაცია და სელექცია

სექვენირების დროს ჩიპზე მიმაგრებული თითოეული დნმ ფრაგმენტის სექვენირების ციკლი მიმდინარეობდა 300-ჯერ, რომლის დროსაც ხდებოდა 150 bp ზომის თანმიმდევრობის წაკითხვა ორივე მიმართულებით.

სექვენირების შედეგად მიღებული პირველადი მონაცემები მუშავდებოდა EDGE Bioinformatics პროგრამის მეშვეობით (*Po-E Li, et al, 2017*), რომელიც უზრუნველყოფდა შემდეგ პროცესებს:

- ხარისხის კონტროლი სტანდარტული პარამეტრებით, როგორცაა მაგ: მინიმალური წაკითხვის სიგრძე - 50 bp, მინიმალური კონტიგის ზომა – 200bp და სხვ.
- გენომის პირველადი (De Novo) აწყობა IDBA აპლიკაციის გამოყენებით (*Po-E Li, et al, 2017*), რომლის შედეგადაც მიიღებოდა თითოეულ შტამზე გარკვეული რაოდენობის დიდი ზომის თანმიმდევრობები ე.წ. კონტიგები. მათი შეფასება ხდებოდა ზომის (მინიმუმ 200 bp) და ხარისხის კონტროლის სხვა პარამეტრებით, რომელთა შორის ყველაზე ყურადსაღებია სტატისტიკური მაჩვენებელი N50, რომლის მიხედვით აწყობილი გენომის ნუკლეოტიდების 50% ხვდება N ზომის კონტიგებში.
- აწყობილი პირველადი გენომების ანოტაცია NCBI პროკარიოტული გენომების ავტომატური ანოტაციის პროგრამის გამოყენებით (*Angiuoli SV, et al, 2008*) (PGAAP revision 3.3; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/Pipeline.html>).

მთლიანმა გენომურმა სექვენირებამ ქართული იზოლატების კიდევ უფრო ღრმა დახასიათების საშუალება მოგვცა; ამისათვის დამატებით გამოყენებული იყო ისეთი მაღალი რეზოლუციის მქონე თანამედროვე მოლეკულური კვლევის მეთოდები როგორებიც არის: ერთ-ნუკლეოტიდური განმეორებები (single-nucleotide repeat - SNR) , გენოტიპირება მრავლობითი ლოკუსების სექვენირებით (multiple-locus sequence typing -

MLST) და დღეისათვის ხელმისაწვდომი 31 VNTR მარკერით ტიპირება სხვადასხვა MLVA პანელების კომბინაციით:

- სრული გენომის სექვენირების პირველადი მონაცემები დამუშავდა პროგრამა CLC bio-ს მეშვეობით (CLC Genomics Workbench software package).
- მოხდა დამცავი PA ანტიგენის *pagA* გენის სექვენს ანალიზი.
- მეტი გენეტიკური ვარიანტის გამოსავლენად, ერთსა და იმავე SNP ჯგუფში, ჩატარდა ანალიზი 4 ყველაზე მეტად პოლიმორფული SNR ლოკუსის (CL10, CL12, CL33, CL35) მიხედვით (*Kenefic Lj, et al, 2008*); გამოყენებულ იქნა ბიოინფორმატიკული პროგრამები - CLC bio და Multiple Alignment using Fast Fourier Transform (MAFFT v7.220; სურათი 15).
- მრავლობითი ლოკუსებით სექვენს ტიპების (STs) შესწავლა მოხდა 7 მოურავი გენის (*glpF, gmk, ilvD, pta, pur, pycA, tpi*) სექვენს ანალიზის მიხედვით (*Helgason E, et al, 2004; Priest FG, et al, 2004; Marston C, et al, 2006*) ალელთა თანამიმდევრობები შედარდა არსებულ რეფერენს შტამებთან *Bacillus cereus* MLST ვებგვერდზე პროგრამა Sequence Comparator გამოყენებით (<http://pubmlst.org/bcereus/>) (სურათი 16).
- წერტილოვანი მუტაციების აღმოჩენის საფუძველზე, ტოქსინში შესაძლო ცვლილებების გამოსავლენად და დამცავი ანტიგენის ტიპირების მიზნით მოხდა *pag* გენის სრული თანამიმდევრობის შეპირისპირება რეფერალურ გენთან.
- AUS94 (A.Br.003) და TEA (A.Br.008) კანონიკურ SNP ჯგუფებში სექვენირებულ 10 იზოლატს შორის დამატებით გენეტიკური პროფილების გამოსავლენად გამოყენებულ იქნა დღეს ხელმისაწვდომი ყველა MLVA პანელი: MLVA-8; MLVA-15; MLVA-25; MLVA-31. ალელთა განმეორებადობის სიხშირე და გენოტიპების იდენტიფიცირება MLVABank-ის გამოყენებით ჩატარდა (სურათი 17)

ა.
s1 GCGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTGATAAAATTGAAAATTCTGTCTTTTTATCTATT
s2 GCGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTGATAAAATTGAAAATTCTGTCTTTTTATCTATT
s3 GCG-----TTTTTTTTTTTTTTTTTTGTTGATAAAATTGAAAATTCTGTCTTTTTATCTATT
s5 GCG-----TTTTTTTTTTTTTTTTTTGTTGATAAAATTGAAAATTCTGTCTTTTTATCTATT
s6 GCG-----TTTTTTTTTTTTTTTTTTGTTGATAAAATTGAAAATTCTGTCTTTTTATCTATT
s7 GCG-----TTTTTTTTTTTTTTTTTTGTTGATAAAATTGAAAATTCTGTCTTTTTATCTATT
s8 GCG-----TTTTTTTTTTTTTTTTTTGTTGATAAAATTGAAAATTCTGTCTTTTTATCTATT
s4 GCG--TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTTGATAAAATTGAAAATTCTGTCTTTTTATCTATT
s9 GCG- -TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTTGATAAAATTGAAAATTCTGTCTTTTTATCTATT
s10 GCG- TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTGATAAAATTGAAAATTCTGTCTTTTTATCTATT
*** *****

ბ.
s1 CTCACGTGCCTCGCTAAAAC TATATCATTATTATTAC --- AAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAA
s2 CTCACGTGCCTCGCTAAAAC TATATCATTATTATTAC --- AAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAA
s3 CTCACGTGCCTCGCTAAAAC TATATCATTATTATTAC --- AAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAA
s5 CTCACGTGCCTCGCTAAAAC TATATCATTATTATTAC --- AAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAA
s6 CTCACGTGCCTCGCTAAAAC TATATCATTATTATTAC --- AAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAA
s7 CTCACGTGCCTCGCTAAAAC TATATCATTATTATTAC --- AAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAA
s8 CTCACGTGCCTCGCTAAAAC TATATCATTATTATTAC --- AAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAA
s4 CTCACGTGCCTCGCTAAAAC TATATCATTATTATTAC -- AAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAA
s9 CTCACGTGCCTCGCTAAAAC TATATCATTATTATTAC AAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAA
s10 CTCACGTGCCTCGCTAAAAC TATATCATTATTATTAC - AAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAA

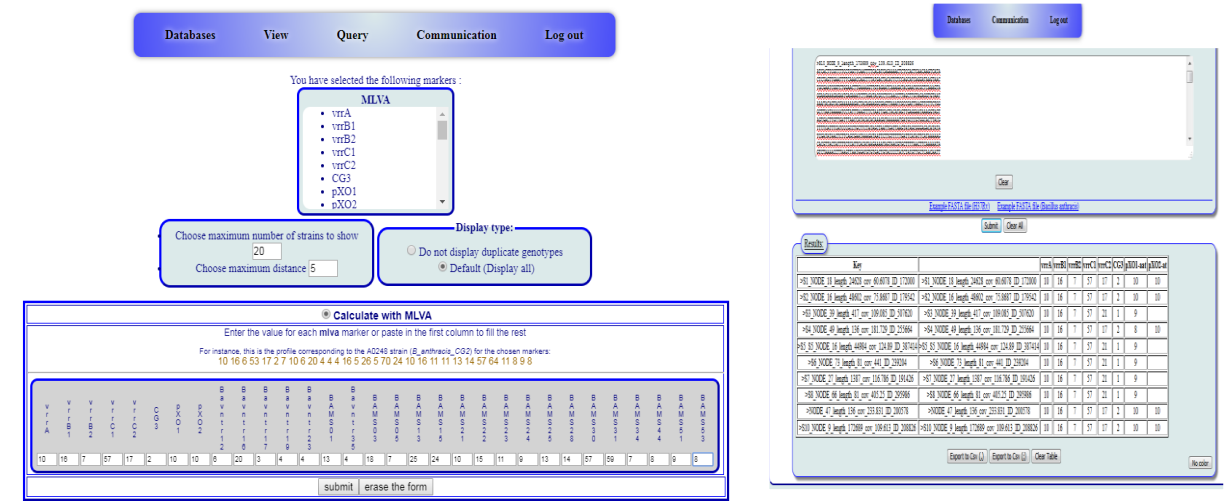
სურათი 15. MAFFT პროგრამაში „Clustal“ ფორმატით შტამებს შორის ურთიერთ განლაგება: (ა) SNR ლოკუსი CL10 (ბ) SNR ლოკუსი CL12

Allele	Length	Start position	End position
glp: 1	372	2528429	2528800
gmk: 1	504	4675239	4675742
ilv: 1	393	980725	981117
pta: 1	414	3291385	3291798
pur: 1	348	3632840	3633187
pyc: 1	363	4554052	4554414
tpi: 1	435	2901375	2901809

MLST

ST	1
clonal complex	Not defined

სურათი 16. MLST – 7 მოურავი გენის აღწერა; სექვენს ტიპის (ST) განსაზღვრა. Sequence Comparator პროგრამა;



სურათი 17. In Silico გენოტიპირების მეთოდი - MLVABank 5.0

4 კვლევის შედეგები

4.1 *B. anthracis* დადასტურება

B. anthracis დიაგნოსტიკისათვის 2006 წლიდან დესჯეც-ში გამოიყენება real-time PCR სისტემა; ტესტირებისას გამოყენებული მაღალსპეციფიკური ნაკრებების (*B. anthracis* DetectionKit Target1, Target 2, BioFire Defense, LLC) საშუალებით მოხდა კვლევისთვის შერჩეული 272 *B. anthracis* სამუეზეუმო შტამის საბოლოო დადასტურება და მათში ვირულენტური ფაქტორების - pXO1 და pXO2 პლაზმიდების განსაზღვრა.

4.2 *B. anthracis* SNP გენოტიპირება

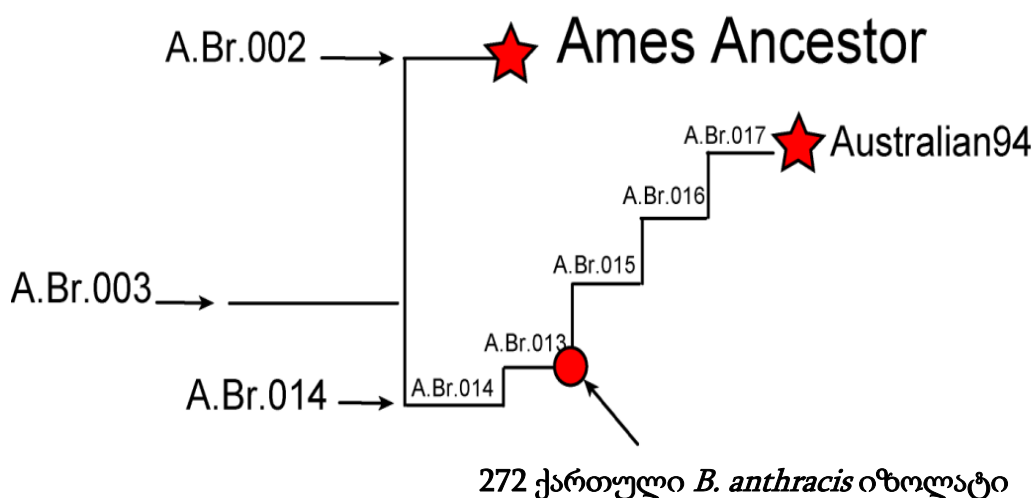
SNP გენოტიპირების პირველ ეტაპზე, ქართული *B. anthracis* შტამების გლობალურ ფილოგენეტიკურ ხეზე განთავსების მიზნით მოხდა 272 იზოლატის შემოწმება ჩრდილო არიზონის უნივერსიტეტის მკვლევარების მიერ შემუშავებული ე.წ. კანონიკურ SNP (canSNP) მარკერებით (*Van Ert, et al, 2007*).

კერძოდ, თითოეულ ნიმუშზე melt-MAMA PCR მეთოდის გამოყენებით დაიდგა სულ 13 კანონიკური SNP განშტოებების შესაბამისი ტესტი (სურათი 18)

Lineage/Group	Type Strain	Sequence	A.Br.001	A.Br.002	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
C.Br.A1055	C.A1055	C.USA.A1055	T	G	A	T	C	T	T	A	T	G	G	T	G
B.Br.KrugerB	B1.A0442	KrugerB	T	G	A	T	C	T	T	A	C	T	A	T	A
B.Br.001/002	B1.A0102		T	G	A	T	C	T	T	A	T	T	A	T	A
B.Br.CNEVA	B2.A0402	CNEVA.9066	T	G	A	T	C	T	T	A	T	G	A	C	A
A.Br.Ames	A2.A0462	Ames	C	A	G	C	A	T	T	A	T	G	G	T	A
A.Br.001/002	A2.A0034		T	A	G	C	A	T	T	A	T	G	G	T	A
A.Br.Aust94	A1.A0039	Australia94	T	G	G	C	A	T	T	A	T	G	G	T	A
A.Br.003/004	A2.A0489		T	G	A	C	A	T	T	A	T	G	G	T	A
A.Br.Vollum	A1.A0488	Vollum	T	G	A	T	A	C	T	A	T	G	G	T	A
A.Br.005/006	A1.A0158		T	G	A	T	A	T	T	A	T	G	G	T	A
A.Br.008/009	A1.A0293		T	G	A	T	A	T	G	A	T	G	G	T	A
A.Br.WNA	A1.A0193	W.N. America	T	G	A	T	A	T	G	G	T	G	G	T	A

სურათი 18. კანონიკური SNP-ჯგუფები

კანონიკური SNP გენოტიპირების შედეგად ყველა 272 ქართული შტამი განეკუთვნა მსოფლიოში ყველაზე ფართოდ გავრცელებულ ჯილხის ჯგუფს - A, კერძოდ კი, ჯგუფში არსებულ A.Br.Aus94 (Aust94) განშტოების A.Br.013 ქვეჯგუფს (სურათი 19) (*Birdsell DN, et al, 2012*).



სურათი 19. *B. anthracis* ქართული შტამები განთავსდა A.Br.013 კანონიკურ ქვეჯგუფში

Aust94 ჯგუფში დამატებითი ფილოგენეტიკური პროფილების (სტრუქტურის) გამოვლენის მიზნით ჩრდილო არიზონის უნივერსიტეტთან (NAU) კოლაბორაციის ფარგლებში ჩატარდა Aust94 გენეტიკურ ჯგუფში წარმოდგენილი სამი ქართული იზოლატის (52-G, 9080-G და 8903-G) სრული გენომის სექვენირება. სექვენირებული გენომების სხვა, სხვადასხვა გეოგრაფიული წერტილებიდან გამოყოფილ რეფერენს შტამებთან (ცხრილი 6) შედარებითი ანალიზის შედეგად მოხდა ჯილქის მხოლოდ ქართული იზოლატებისთვის სპეციფიკური SNP ლოკუსების იდენტიფიცირება;

ცხრილი 6. კვლევაში გამოყენებული *B. anthracis* რეფერენს შტამები.

*-ით აღნიშნულია ქართული იზოლატები

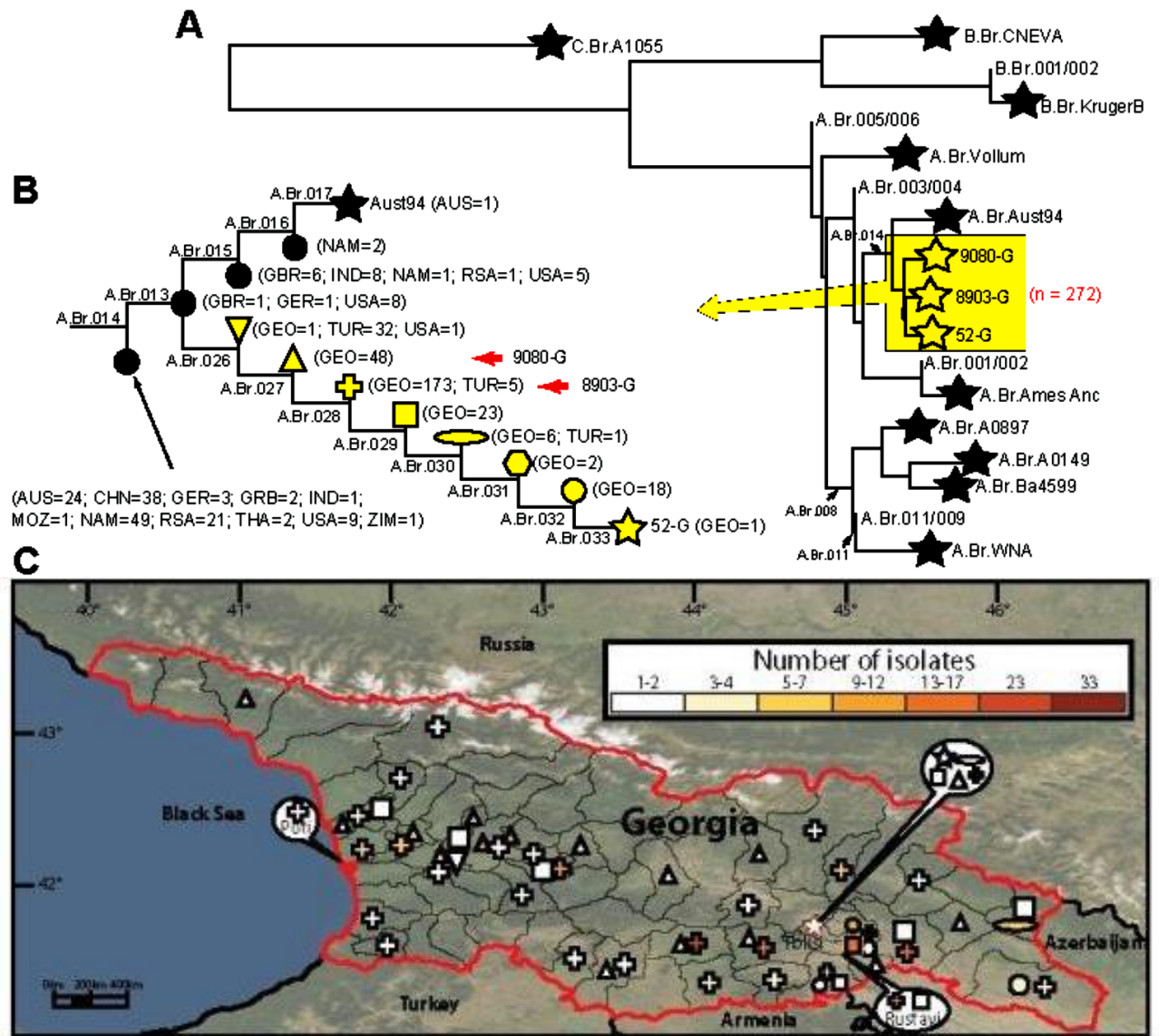
რეფერენს შტამები	GenBank -ის მიერ მინიჭებული ნომერი
C.Br.A1055	PRJNA54131, PRJNA10795 AAEO00000000.1
B.Br.KrugerB	PRJNA324 and AAEQ00000000
B.Br.CNEVA-9066	PRJNA10796 and AAEN00000000
A.Br.Ames Ancestor	PRJNA10784 and AE017334
A.Br.Aust94	PRJNA10799 and AAES00000000
A.Br.Vollum	PRJNA10797 and AAEP00000000
A.Br.W.N. America	PRJNA337 and AAER00000000
A.Br.Ba4599	AGQP00000000 and AGQP01000000
A.Br.A0149	SRX562299
A.Br.A0897	SRX541689
A.Br.9080-G *	PRJNA224558
A.Br.8903-G *	PRJNA224562
A.Br.52-G *	PRJNA224563

შერჩეული SNP ლოკუსებისთვის შემუშავდა 26 SNP გენოტიპირების ტესტი, რომლებიც დიზაინირებული იყო როგორც SYBR Green პლატფორმაზე დამყარებული real-time PCR

ანუ ე.წ. melt-MAMA ანალიზისათვის, ასევე გელ-ელექტროფორეზით მიმდინარე PCR რეაქციისათვისაც.

26 ტესტისგან შემდგარ, უკვე შემუშავებულ და ვალიდირებულ პანელზე ქართული იზოლატების შემოწმების შედეგად გამოიკვეთა 8 ახალი SNP გენეტიკური ქვეჯგუფი, რომელთა შორის მოხდა კვლევაში ჩართული ყველა ქართული იზოლატის განთავსება. გამომდინარე იქიდან, რომ შერჩეულმა 26-მა SNP ლოკუსმა გამოავლინა მხოლოდ 8 ერთმანეთისგან განსხვავებული ქართული განშტოება, Melt-MAMA რეაქციებისათვის ლლობის მრუდების ხარისხის გათვალისწინებით მოხდა თითო ქვეჯგუფისთვის სპეციფიკური ერთი კანონიკური SNP-ის განსაზღვრა (A.Br.026 - A.Br.033).

ამასთან ერთად, აღნიშნული პანელით შემოწმდა NAU კოლექციაში არსებული მსოფლიოს სხვადასხვა ქვეყნიებიდან (ავსტრალია, ჩინეთი, ინგლისი, გერმანია, ინდოეთი, მოზამბიკი, ნამიბია, ზიმბაბვე, სამხრეთ აფრიკა, შოტლანდია, ტაილანდი, თურქეთი და აშშ) იზოლირებული *B. anthracis* 224 შტამი. ტესტირების შედეგად, NAU კოლექციიდან 49 იზოლატი შემდეგი გეოგრაფიული ლოკაციებიდან: აშშ (9), გერმანია (1), ინგლისი (1) და თურქეთი (38) დანარჩენ ქართულ შტამებთან ერთდ განთავსდა ახლად აღმოჩენილ ქართულ ქვეჯგუფებში (სურათი 20).



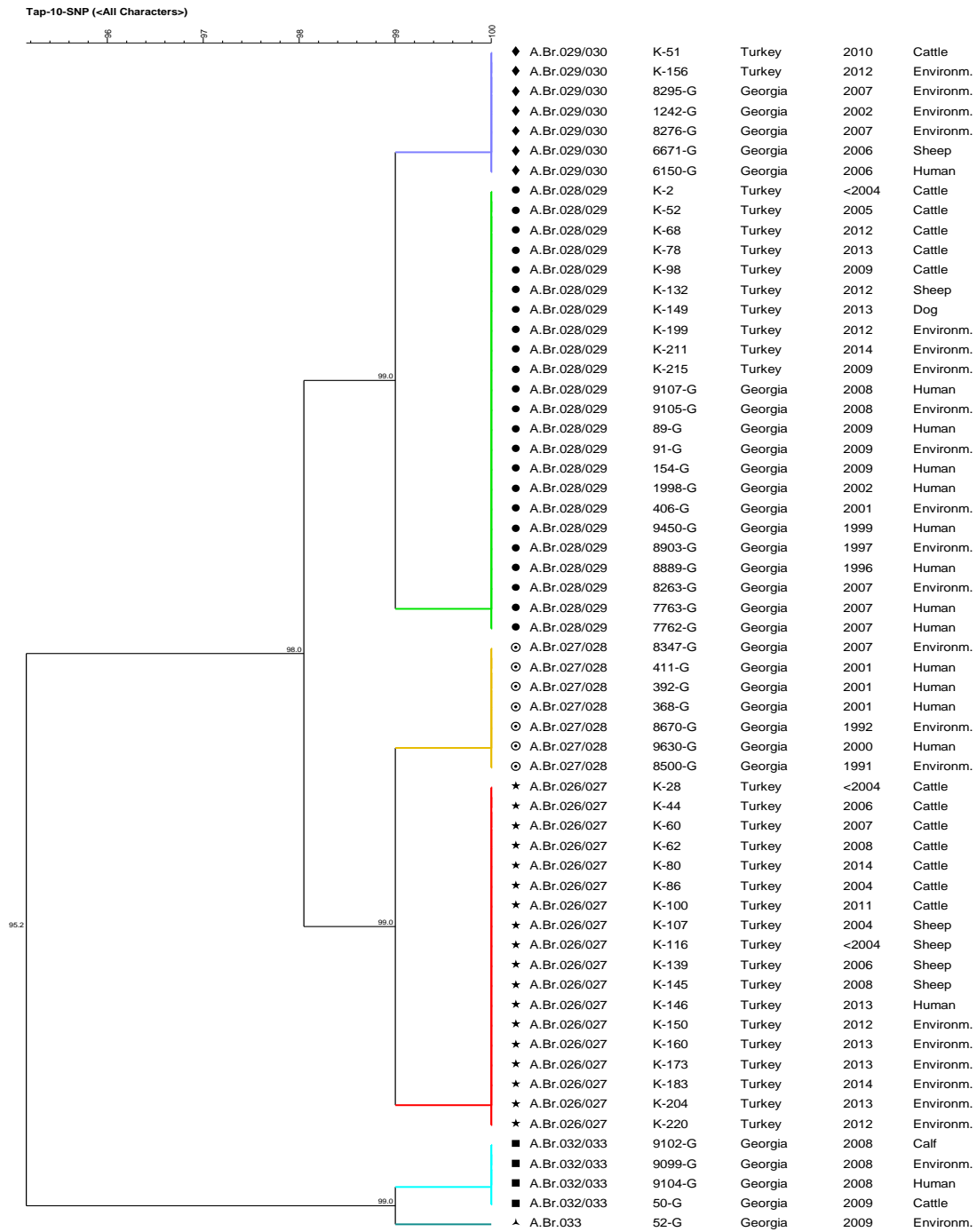
სურათი 20. *B. anthracis* ფილოგენეტიკა საქართველოში. A) სექვენირებული რეფერენს და ქართული იზოლატები განთავსებული მთლიანი გენომის სექვენირების ფილოგენეტიკურ ხეზე. ტერმინალური ქვეჯგუფების წარმომადგენელი სექვენირებული შტამები მონიშნულია ვარსკვლავებით. B) Aust94 და კანონიკური SNP ჯგუფების გადანაწილება ქართულ განშტოებაში. C) 272 ქართული *B. anthracis* იზოლატის ფილოგეოგრაფია დატანილია ქვეყნის რუქაზე რაიონების მიხედვით.

ზემოთ მოყვანილმა შედეგებმა ცხადყო რომ თურქეთში მოცირკულირე ჯილეხის შტამები გენეტიკურად ახლოს დგას საქართველოში იზოლირებულ შტამებთან; სწორედ ამიტომ, ჩვენ გადაწყვიტეთ გაგვეგრძელებინა კვლევა და შეგვესწავლა ჩვენს რეგიონში, კერძოდ კი საქართველოსა და თურქეთში მოცირკულირე *B. anthracis* საერთო გენეტიკური ვარიანტების არსებობა; ამისათვის, ლუგარის სჯ კვლევით

ცენტრში დვსჯეც და თურქეთის ყარსის უნივერსიტეტის საერთო კოლაბორაციის ფარგლებში მოხდა სხვადასხვა წყაროებიდან და სხვადასხვა წელს თურქეთში იზოლირებული ჯილეხის 30 შტამის SNP გენოტიპირება. თურქული იზოლატები შემოწმდა მსოფლიო და ქართულ კანონიკურ SNP გენოტიპირების პანელებზე და მოხდა მათი შედარება 30 ქართულ ჯილეხის შტამთან, რომელთა SNP ჯგუფებში გადანაწილება უკვე ცნობილი იყო. კვლევის შედეგად ყველა თურქული იზოლატი ქართულების მსგავსად განთავსდა Aust94 განშტოების – A.Br.013/015 ქვეჯგუფში; ქართულ პანელზე ტესტირების შედეგად თურქულმა შტამებმა აჩვენეს მცირედი განსხვავება ქართულ შტამებთან შედარებით და ისინი გადანაწილდნენ სამ SNP ქვეჯგუფში: ყველა განეკუთვნა A.Br.026/027 ; A.Br.028/029; A.Br.029/030 (ცხრილი 7). კლასტერული ანალიზი და დენდროგრამის აგება მოხდა პროგრამა Bionumerics v6.6, Applied Maths გამოყენებით (სურათი 21)

ცხრილი 7. *B. anthracis* ქართული და თურქული შტამების გადნაწილება SNP ჯგუფებში

შტამის #	იზოლაციის წელი	ქვეყანა	იზოლაციის წყარო	მსოფლიო კანონიკური SNP ჯგუფი	ქართული კანონიკური SNP ჯგუფი
8347-G	2007	საქართველო	გარემო	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.027/028
8295-G	2007	საქართველო	გარემო	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.029/030
9102-G	2008	საქართველო	პირუტყვი	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.032/033
9099-G	2008	საქართველო	გარემო	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.032/033
9104-G	2008	საქართველო	ადამიანი	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.032/033
9107-G	2008	საქართველო	ადამიანი	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.028/029
9105-G	2008	საქართველო	გარემო	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.028/029
89-G	2009	საქართველო	ადამიანი	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.028/029
52-G	2009	საქართველო	გარემო	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.033
50-G	2009	საქართველო	პირუტყვი	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.032/033
91-G	2009	საქართველო	გარემო	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.028/029
154-G	2009	საქართველო	ადამიანი	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.028/029
1242-G	2002	საქართველო	გარემო	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.029/030
1998-G	2002	საქართველო	ადამიანი	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.028/029
411-G	2001	საქართველო	ადამიანი	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.027/028
406-G	2001	საქართველო	გარემო	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.028/029
392-G	2001	საქართველო	ადამიანი	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.027/028
368-G	2001	საქართველო	ადამიანი	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.027/028
8670-G	1992	საქართველო	გარემო	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.027/028
9630-G	2000	საქართველო	ადამიანი	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.027/028
9450-G	1999	საქართველო	ადამიანი	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.028/029
8903-G	1997	საქართველო	გარემო	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.028/029
8889-G	1996	საქართველო	ადამიანი	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.028/029
8500-G	1991	საქართველო	გარემო	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.027/028
8276-G	2007	საქართველო	ნიდაგი	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.029/030
8263-G	2007	საქართველო	ნიდაგი	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.028/029
7763-G	2007	საქართველო	ადამიანი	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.028/029
7762-G	2007	საქართველო	ადამიანი	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.028/029
6671-G	2006	საქართველო	პირუტყვი	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.029/030
6150-G	2006	საქართველო	ადამიანი	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.029/030
K-2	<2004	თურქეთი	პირუტყვი	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.028/029
K-28	<2004	თურქეთი	პირუტყვი	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.026/027
K-44	2006	თურქეთი	პირუტყვი	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.026/027
K-51	2010	თურქეთი	პირუტყვი	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.029/030
K-52	2005	თურქეთი	პირუტყვი	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.028/029
K-60	2007	თურქეთი	პირუტყვი	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.026/027
K-62	2008	თურქეთი	პირუტყვი	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.026/027
K-68	2012	თურქეთი	პირუტყვი	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.028/029
K-78	2013	თურქეთი	პირუტყვი	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.028/029
K-80	2014	თურქეთი	პირუტყვი	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.026/027
K-86	2004	თურქეთი	პირუტყვი	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.026/027
K-98	2009	თურქეთი	პირუტყვი	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.028/029
K-100	2011	თურქეთი	პირუტყვი	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.026/027
K-107	2004	თურქეთი	პირუტყვი	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.026/027
K-116	<2004	თურქეთი	პირუტყვი	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.026/027
K-132	2012	თურქეთი	პირუტყვი	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.028/029
K-139	2006	თურქეთი	პირუტყვი	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.026/027
K-145	2008	თურქეთი	პირუტყვი	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.026/027
K-146	2013	თურქეთი	ადამიანი	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.026/027
K-149	2013	თურქეთი	ძაღვი	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.028/029
K-150	2012	თურქეთი	გარემო	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.026/027
K-156	2012	თურქეთი	გარემო	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.029/030
K-160	2013	თურქეთი	გარემო	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.026/027
K-173	2013	თურქეთი	გარემო	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.026/027
K-183	2014	თურქეთი	გარემო	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.026/027
K-199	2012	თურქეთი	გარემო	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.028/029
K-204	2013	თურქეთი	გარემო	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.026/027
K-211	2014	თურქეთი	გარემო	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.028/029
K-215	2009	თურქეთი	გარემო	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.028/029
K-220	2012	თურქეთი	გარემო	A.Br.Aus94/A.Br.013/015	A.Br.026/027



სურათი 21. *B. anthracis* ქართული და თურქული შტამების SNP დენდროგრამა

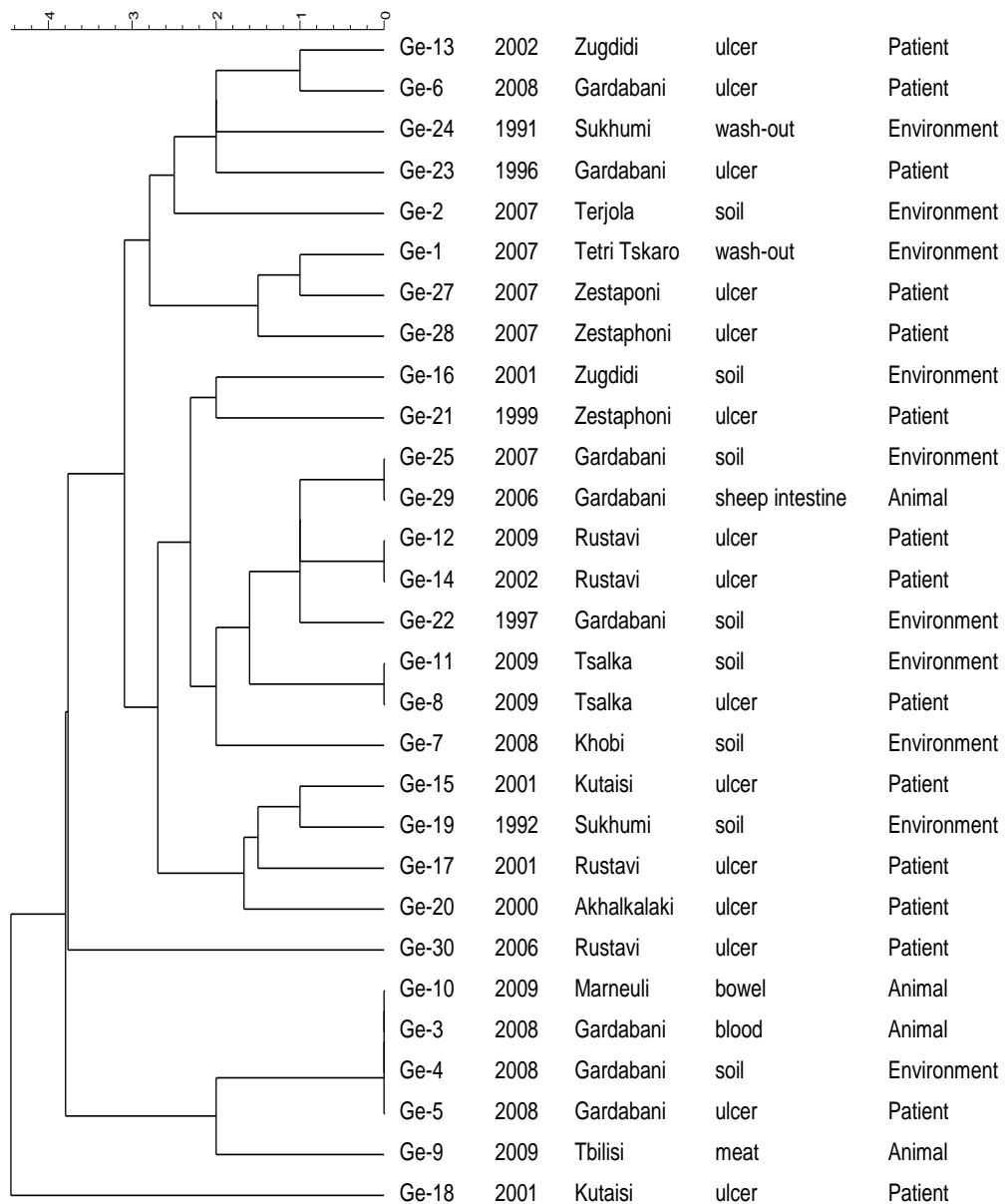
4.3 *B. anthracis* MLVA გენოტიპირება

ახლად აღმოჩენილ SNP ჯგუფებში დამატებითი გენოტიპების გამოსავლენად MLVA კვლევისთვის შეირჩა საქართველოში იზოლირებული სხვადასხვა SNP ჯგუფების წარმოდგენილი 30 *B. anthracis* შტამი; შტამების ჩამონათვალი წარმოდგენილია ზემოთ წარმოდგენილ მე-7 ცხრილში.

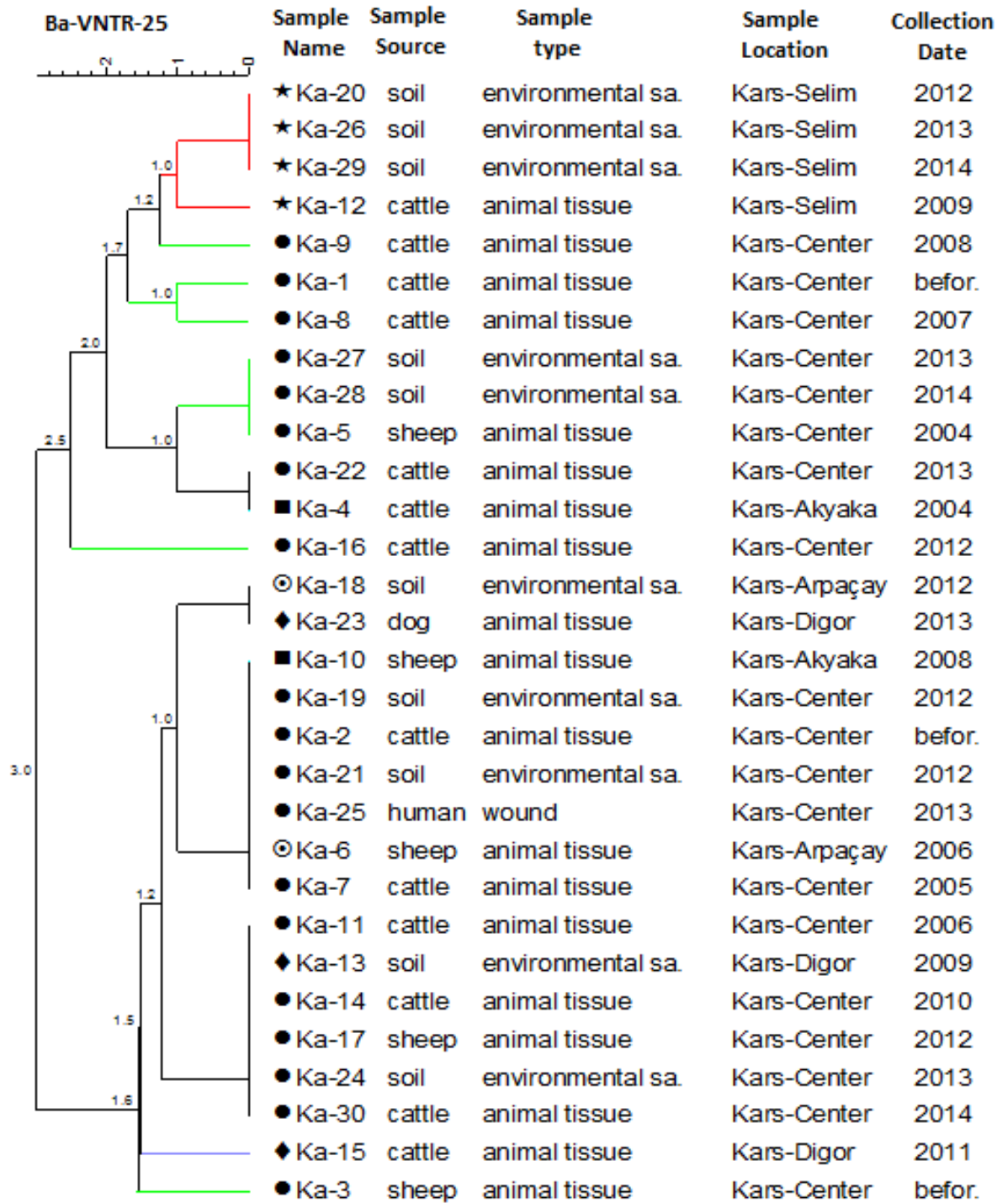
ქართული შტამების MLVA-25 გენოტიპირების შედეგების თანახმად, კვლევაში ჩართულმა ყველა *B. anthracis* იზოლატმა აჩვენა მეტი მრავალფეროვნება SNP ჯგუფებს შიგნით და გადანაწილდა მცირე MLVA კლასტერებად (სურათი 21). აღსანიშნავია ის ფაქტი რომ, ერთ-ერთ ასეთ კლასტერში ნანახი იყო იდენტური MLVA გენოტიპის მქონე შტამები, რომლებიც გამოყოფილი იყო პირუტყვიდან (Ge-3 9102-G), ნიადაგიდან (Ge-4 9099-G) და პაციენტიდან (Ge-5 9104-G) და ერთი და იგივე კერიდან (გარდაბანი, 2008 წ.), რაც ცალსახად მიუთითებს ინფექციის წყაროს წარმომავლობაზე (სურათი 22).

ამასთან ერთად აქაც, ისევე როგორც SNP გენოტიპირებისას, კვლევაში თურქეთში იზოლირებული ჯილეხის შტამებიც იყო გამოყენებული (ცხრილი 7). თურქული შტამების MLVA-25 გენოტიპირებამ გამოავლინა ორი ძირითადი MLVA კლასტერი (პირობითად A და B კლასტერები) და მათში გადანაწილებული 13 MLVA ქვეჯგუფი (*Khmaladze E, et al, 2017*); აქედან A კლასტერში გამოიკვეთა 8 ქვეჯგუფი და აღმოჩნდა უფრო მრავალფეროვანი ვიდრე კლასტერი B, რაც შესაძლებელია დაკავშირებული იყოს გამოკვლეული შტამების მცირე რაოდენობასთან და შტამების გამოყოფის ერთი და იგივე ადგილმდებარეობასთან (ყარსი, თურქეთი) (სურათი 23).

ქართული და თურქული ჯილეხის შტამების MLVA-25 გენოტიპირების შედეგად აგებული დენდროგრამების შედარებისას გამოიკვეთა ორი დიდი კლასტერი - ქართული და თურქული იზოლატებით. თითოეულ კლასტერში შედიოდა ცალკე ქართული და ცალკე თურქული შტამები; გამოიკვეთა, რომ *B. anthracis* შტამები ნაკლებად ექვემდებარებიან გენეტიკურ ცვლილებებს და აქვთ შედარებით სტაბილური გენომი გარკვეული დროის განმავლობაში.



სურათი 22. *B. anthracis* ქართული შტამების MLVA-25 დენდროგრამა



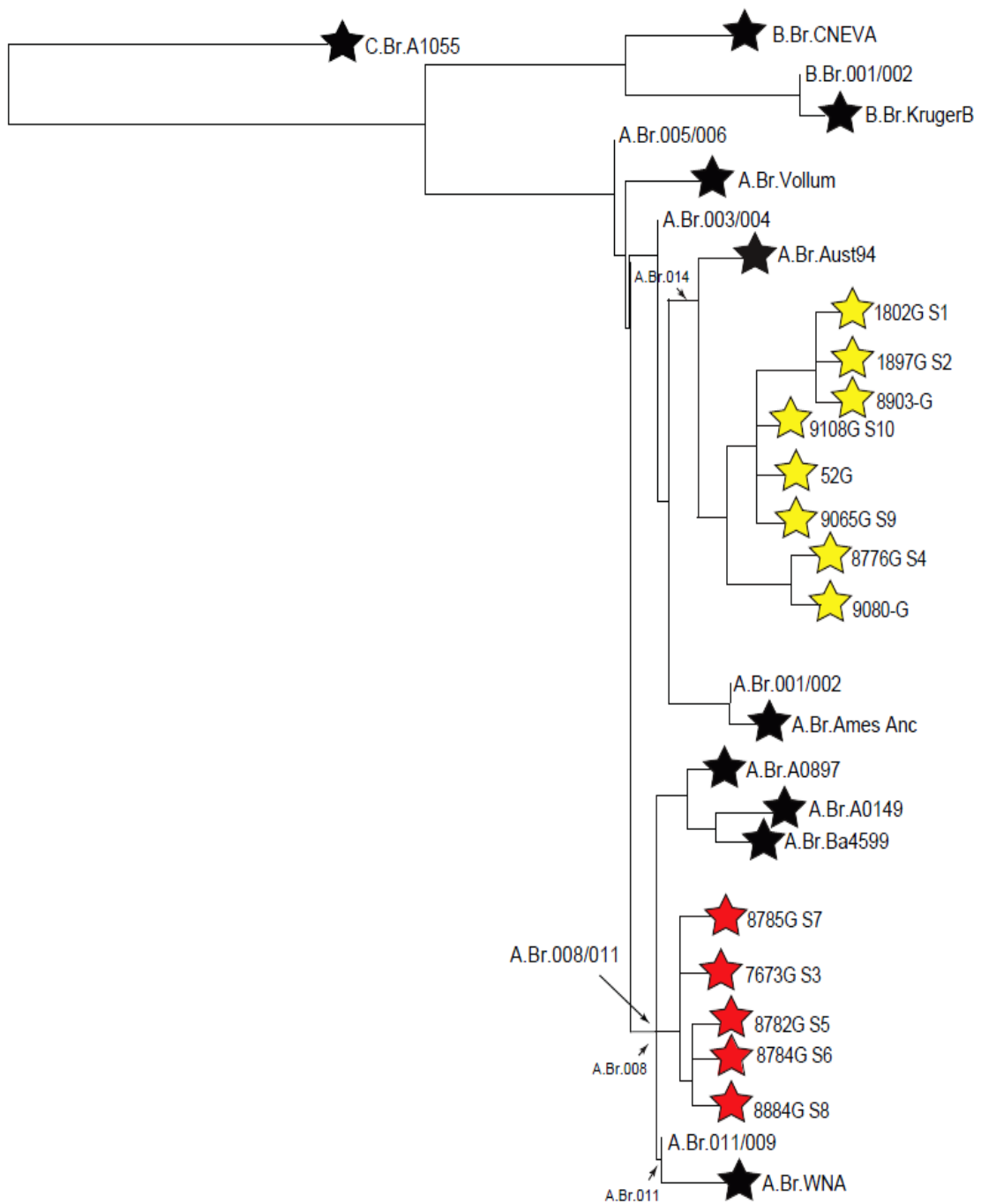
სურათი 23. *B. anthracis* თურქული შტამების MLVA-25 დენდროგრამა

4.4 *B. anthracis* სრული გენომის სექვენირება - WGS

AUS94 (A.Br.003) და TEA (A.Br.008) კანონიკურ SNP ჯგუფებთან ასოცირებული ქართული *B. anthracis* იზოლატების მთლიანი გენომის სექვენირების ანალიზის შედეგად გამოვლინდა შემდეგი: ის ქრომოსომული (codY; feoB) (*Château A, et al, 2011; Chatterjee A, et al, 2018*) და პლაზმიდური გენები (cya, lef, pagA, sigB, capB, capC, capA) რომლებიც მნიშვნელოვან როლს თამაშობენ ჯილეხის ბაქტერიის ვირულენტობის განსაზღვრაში, გამოირჩევიან მაღალი კონსერვატულობით, მაშინ როდესაც ამ ორ SNP ჯგუფში შემავალ ჯილეხის შტამების გენომებში გამოვლინდა სხვადასხვა პლაზმიდური პროფილი. კერძოდ კი, არცერთ 5 შტამში, რომლებიც განეკუთვნა TEA კანონიკურ SNP ჯგუფს pXO2 პლაზმიდა არ აღმოჩნდა, AUS94 იზოლატები კი ორივე pXO1 და pXO2 პლაზმიდით იყვნენ წარმოდგენილნი.

გარდა ამისა, აღნიშნული 10 შტამის სექვენირების შემდეგ მოხდა 28 ახალი, ქართული შტამებისთვის სპეციფიკური SNP ლოკუსების აღმოჩენა. მომავალ კვლევებში დაგეგმილია აღნიშნული SNP-ებისთვის Melt-MAMA ტიპირების ტესტების შემუშავება hler და მათი უკვე არსებულ SNP გენოტიპირების ქართულ პანელზე დამატება.

მთლიანობაში სექვენირებულია საქართველოში გამოყოფილი 13 ჯილეხის შტამი. სრული გენომური სექვენსის შედეგებზე დაყრდნობით აიგო ფილოგენეტიკური ხე, რომელმაც საქართველოში გამოყოფილი ჯილეხის შტამები განათავსა გლობალურ ფილოგენეტიკურ რუქაზე (სურათი 24).



სურათი 24. *B. anthracis* 13 ქართული გენომი განთავსებული გლობალურ ფილოგენეტიკურ ხეზე

სექვენირებული *B. anthracis* ქართული შტამების თანმიმდევრობები აიტვირთა გენომური ბანკის მონაცემთა ბაზაში (BioProject PRJNA336484) (ცხრილი 8) (Khmaladze E, et al, 2017).

ცხრილი 8. *B. anthracis* შტამების სექვენირებისა და აწრობის შემდეგ მიღებული მაჩვენებლები

შტამის #	იზოლაციის წელი	იზოლაციის წყარო	GenBank -ის მიერ მინიჭებული ნომერი	კონტიგების რაოდენობა	გადაფარვის მაჩვენებელი	N50 კონტიგების რაოდენობა	კოდირებული ცილების რაოდენობა
1802-G	2012	ადამიანი	MVKJ00000000	78	119.35	365,205	5,722
1897/12-G	2012	საქონლის ხორცი	MVKH00000000	88	132.10	413,677	5,723
8776-G	1992	ადამიანი	MVKI00000000	81	141.80	331,561	5,719
9065-G	2008	ადამიანი	MVKG00000000	70	209.11	331,561	5,724
9108-G	2008	ადამიანი	MVKF00000000	95	157.55	432,600	5,727
7673-G	1989	ნიადაგი	MVKE00000000	86	211.16	868,539	5,618
8782-G	1992	ცხვრის ტყავი	MVKD00000000	84	98.30	287,604	5,618
8784-G	1992	საქონლის ხორცი	MVKC00000000	72	195.48	266,373	5,618
8785-G	1992	ადამიანი	MVKB00000000	70	154.38	313,727	5,616
8884-G	1994	ადამიანი	MVIR00000000	69	168.97	320,727	5,616

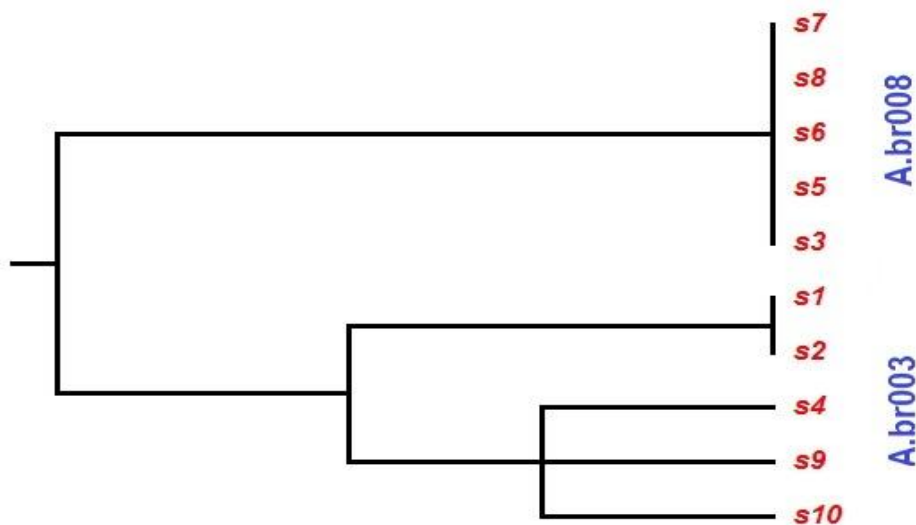
B. anthracis ათი სრული გენომური სექვენირების გარდა მოხდა შტამების მაღალი გარჩევადობის (თუ რეზოლუციის) მქონე მეთოდებით დამუშავება, რის შედეგადაც გამოვლინდა შემდეგი ფაქტები:

- *pagA* გენის სექვენსის ანალიზმა სულ გამოავლინა ორი მუტაცია: სინონიმური და არა-სინონიმური (მისენს) - მუტაცია. მისენს-მუტაცია ლოკალიზებული იყო მაღალი ანტიგენობის მქონე უბნის მომიჯნავედ და იწვევდა ალანინ ↔ ვალინის ცვლილებას, ამით კი კრიტიკულ როლს ასრულებდა ლეტალურ ფაქტორთან (LF) დაკავშირებაში. აღნიშნული მუტაციების გამოვლენა საფუძვლად დაედო ორი PA გენოტიპის (PA genotype I; PA genotype V) და ორი PA ფენოტიპის (FPA; FPV) (*Price L, et al, 1999*) განსაზღვრას (ცხრილი 9);

ცხრილი 9. *pagA* გენის ანალიზის შედეგები

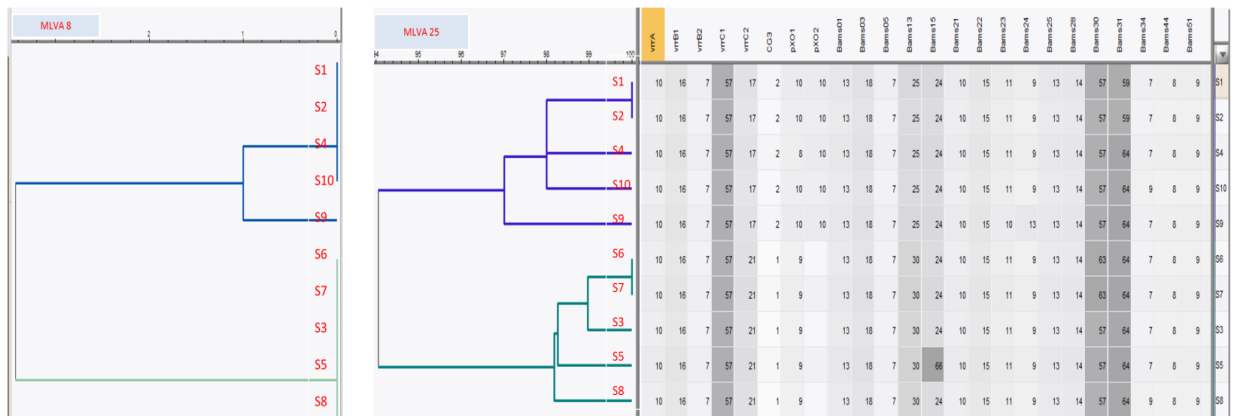
შტამის #	PA გენოტიპი	PA ფენოტიპი	სიხშირე	მუტაციის პოზიცია/ ნუკლეოტიდი	
				1998	3602
7673-G, 8782-G, 8784-G, 8785-G, 8884-G	I	FPA	5/10.	C	C(A)
1897/12-G, 8776-G, 9108-G, 1802-G, 9065-G	V	FPV	5/10.	T	T(V)

- ოთხი პოლიმორფული SNR ლოკუსის (CL10, CL12, CL33, CL35) ანალიზის მიხედვით ჩატარებული კვლევის შედეგად მოხდა ერთი და იგივე კანონიკური SNP ჯგუფის შიგნით ჯილხის შტამების დაყოფა. ჯამში ორ კანონიკურ SNP ჯგუფს შორის ხუთი სხვადასხვა SNR გენოტიპი გამოიკვეთა; A.Br.008 ჯგუფში ინახა მხოლოდ ერთი, ხოლო A.Br.003-ში ოთხი SNR პროფილი (სურათი 25).



სურათი 25. SNR-კვლევის შედეგად აგებული დენდროგრამა გამოყენებული პროგრამები -Genius 7.0.6 და MEGA6

- შვიდი მოურავი გენის (*glpF*, *gmk*, *ilvD*, *pta*, *pur*, *pycA*, *tpi*) MLST გენოტიპირებამ კვლევაში ჩართული ათივე შტამის იდენტიფიცირება მოახდინა როგორც სექვენს ტიპი (ST) 1.
- MLVA-8 და MLVA-15 პანელით კვლევამ AUS94 (A.Br.003) და TEA (A.Br.008) კანონიკურ SNP ჯგუფებში 10 *B. anthracis* იზოლატს შორის გამოავლინა სამი სხვადასხვა MLVA გენოტიპი; MLVA-25 და MLVA-31 მეთოდებმა აჩვენეს გარჩევადობის გაცილებით უფრო მაღალი უნარი და მოახდინეს შტამებს შორის რვა, ხოლო თითოეულ SNP ჯგუფში 4 უნიკალური MLVA გენოტიპის აღმოჩენა (სურათი 26).



სურათი 26. 10 *B. anthracis* იზოლატზე MLVA8 / MLVA 15 და MLVA25 / MLVA 31 კვლევების მიხედვით აგებული დენდროგრამა (BioNumerics v. 7.6 პროგრამა)

5 დისკუსია

პათოგენური მიკროორგანიზმების ენდემური და არაადგილობრივი შტამების ერთმანეთისგან გამიჯვნა საკმაოდ რთულ საკითხს წარმოადგენს, რაც თავისმხრივ შესაძლოა გამოიხატოს ბუნდოვანი ფილოგეოგრაფიული სტრუქტურის ჩამოყალიბებაში. სწორედ ამიტომ, ძალზედ მნიშვნელოვანია ინტენსიური რეგიონალური კვლევები არა მხოლოდ ენდემური შტამების იდენტიფიცირებისა და გავრცელების განსაზღვრისთვის, არამედ დაავადების გამომწვევის გლობალური ფილოგენეტიკური პრინციპების?? დადგენისათვის.

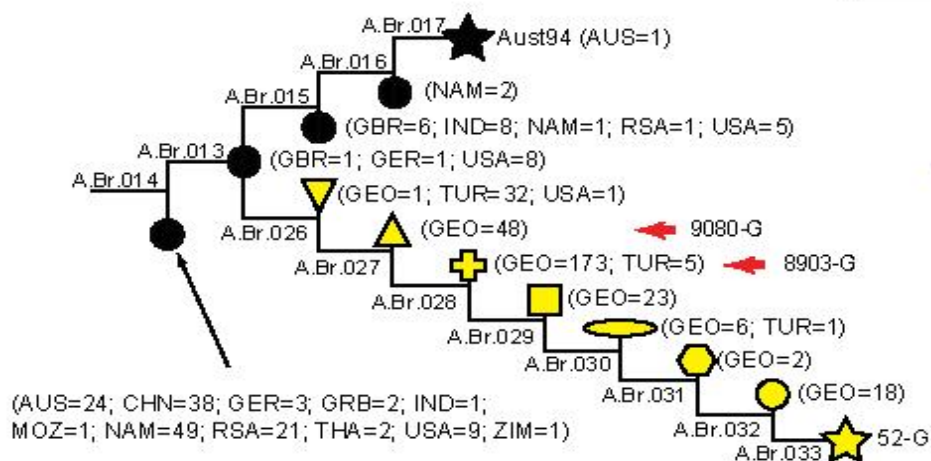
საქართველო, თავისი ისტორიული მნიშვნელობისა და თავისებური გეოგრაფიული ლოკაციით - შავ და კასპიის ზღვებს შორის, ევროპისა და აზიის გასაყარზე დიდ ინტერესს იწვევს ჯილეხის გამომწვევის მსოფლიო გავრცელების გზების შესწავლის თვალსაზრისით.

აღნიშნულ სადისერტაციო ნაშრომში აღწერილი canSNP ანალიზის გამოყენებით 272 ქართული იზოლატის კვლევის შედეგად გამოვლინდა, რომ ყველა მათგანი მიეკუთვნა Australia94 (Aust94) განშტოებას. ქართული Aust94 იზოლატების გეოგრაფიული თუ ფილოგენეტიკური მრავალფეროვნება, აღნიშნულ რეგიონში სხვა მკვლევარების მიერ MLVA A3a იზოლატების დეტექციასთან ერთად (მკაცრად ეკვივალენტურია Aust94 წარმომავლობის მიმართ), წამოადგენს ამ შტოს ეკოლოგიური დამკვიდრების ძლიერ მტკიცებულებას. Aust94 ჯგუფის წევრების იდენტიფიცირება მოხდა ხუთივე კონტინენტის ქვეყნებში (ავსტრალია, ჩინეთი, ინგლისი, გერმანია, ინდოეთი, მოზამბიკი, ნამიბია, ზიმბაბვე, შოტლანდია, სამხრეთ აფრიკა, ტაილანდი, თურქეთი და საქართველო), რაც მიუთითებს ჯილეხის უკიდურესად ფართო გავრცელებაზე / გაბნევაზე. თუმცა ამ განშტოების დეტალური ფილოგეოგრაფია ჯერჯერობით სრულად არ არის აღწერილი.

სრული გენომური SNP ფილოგენეტიკურ ხეზე, რომლის აგებისათვის გამოყენებული იყო ჯილეხის 13 რეფერენს შტამი, სამი ქართული იზოლატი (9080-G; 8903-G და 52-G) განთავსდა Aust94 გენეტიკურ ჯგუფში. ჩრდილო არიზონის უნივერსიტეტის B.

anthracis შტამების მსოფლიო კოლექციის სკრინინგმა მანამდე შემუშავებულ კანონიკურ SNP ნაკრებზე, გამოავლინა Aust94 განშტოების ხუთი გენეტიკური ქვეჯგუფი (A.Br.014; A.Br.013; A.Br.015; A.Br.016; A.Br.017). ჩვენი კვლევის ფარგლებში შემუშავებული SNP პანელის მეშვეობით კი. გლობალურ ხეზე გაჩნდა ახალი, 52-G შტამის გენომით განსაზღვრული, ე.წ. ქართული განშტოება, რომელიც ქართული შტამებისთვის სპეციფიკური რვა ქვეჯგუფით დაკომპლექტდა (A.Br.026; A.Br.027; A.Br.028; A.Br.029; A.Br.030; A.Br.031; A.Br.032; A.Br.033).

განშტოებები და მათი ტოპოლოგია გენოტიპირებულ, თუმცა არასექვენირებულ იზოლატებში ბოლომდე არ ვლინდება, რჩება უცნობი, ფილოგენეტიკური აღმოჩენების სისტემური ცდომილებისა და განშტოებების კოლაფსის გამო, თუმცა მათი ნათესაური კავშირი უტყუარია. A.Br.014 და A.Br.013 ქვეჯგუფების გამაერთიანებელი კვანძიდან სათავეს იღებს ყველაზე ბაზალური და მრავალფეროვანი SNP ჯგუფი რომელიც აერთიანებს იზოლატებს 5 სხვადასხვა კონტინენტიდან. A.Br.013/015 ქვეჯგუფი მოიცავს იზოლატებს ევროპიდან (n=2) და აშშ-დან (n=8). გარდა ამისა, A.Br.013/015 ჯგუფიდან სათავეს იღებს განშტოება, რომელშიც გაერთიანებულია 272 ქართული იზოლატი და ასევე განშტოება, რომელიც ბოლოვდება Aust94 შტამით (სურათი 27).



სურათი 27. A.Br.013/015 ჯგუფის Aust94 და 52-G განშტოებები

მიუხედავად იმისა, რომ A.Br.013/015 SNP ჯგუფში ევროპისა და აშშ-ს იზოლატების იდენტიფიკაცია მოხდა, ეს გენეტიკური ჯგუფი არ არის ეკოლოგიურად დამკვიდრებული აღნიშნულ რეგიონებში და შესაბამისად, ნაკლებ სავარაუდოა, ჯილეხის გამოჩენა საქართველო / თურქეთის რეგიონებში ამ ტერიტორიებიდან ყოფილიყო განპირობებული. მეტიც, აღნიშნული იზოლატების არსებობა ევროპასა და აშშ-ში, სავარაუდოდ, დაკავშირებულია კონტამინირებული პროდუქტების იმპორტირებასთან - შესაძლოა ერთი და იმავე გეოგრაფიული რეგიონიდან, რომელიც კავშირშია ჯილეხის საქართველო/ თურქეთის რეგიონში გავრცელებაზე. წყაროს დასაზუსტებლად საჭიროა, ჩატარდეს ძირითადი განშტოების დამატებითი ფილოგეოგრაფიული კვლევები ინტერესის რეგიონებში.

A.Br.013/015 ჯგუფის უფრო დეტალური შესწავლისა და ქართული პოპულაციის სტრუქტურის განსაზღვრის მიზნით, მოხდა ამ ჯგუფის ყველა წევრის სკრინინგი (272 ქართული იზოლატის ჩათვლით) ახლად აღმოჩენილი 26 ქართული შტამებისთვის სპეციპიკური SNP ანალიზის მეშვეობით; მოხდა აღნიშნული განშტოების რვა ახალი ქვეჯგუფის აღმოჩენა. ყველა ქართული იზოლატი გადანაწილდა ამ რვა ახალ ქვეჯგუფში (სურათი 27) (დანართი 1); ამასთან, ზოგიერთი იზოლატი თურქეთიდან და ერთი - აშშ-დან ასევე განთავსდა ამავე ქვეჯგუფებში, რომელიც როგორც ზემოთ აღნიშნა შესაძლოა კავშირში იყოს კონტამინირებული პროდუქტის იმპორტირებასთან. აღნიშნულ კვლევაში ჩართული თურქული იზოლატების უმრავლესობა მიეკუთვნა 52-G შტოს გამაერთიანებელ ბაზალურ მუხლს. თუმცა, ვინაიდან ჩვენ არ ვიცით აღნიშნული ბაზალური მუხლის ფილოგენეტიკური ტოპოლოგია, შეუძლებელია, განვსაზღვროთ ეს ჯგუფი პირველად თურქეთში გამოჩნდა და შემდეგ გავრცელდა საქართველოში თუ პირიქით; ორივე სცენარი თანაბრად ახლოს არის სიმართლესთან. თურქული იზოლატების არსებობა კიდევ უფრო ძველ ორ საკვანძო წერტილში, რომლის წინამორბედი იყო ქართული განშტოება, მიგვითითებს სულ მცირე ორი გავრცელების შემთხვევაზე საქართველოდან თურქეთში (სურათი 27). მეზობელი ქვეყნებიდან ჯილეხის შტამების დამატებითი კვლევა საშუალებას მოგვცემს უფრო ღრმა დეტალებში შევისწავლოთ ქართული (52-G) განშტოების გეოგრაფიული

საზღვრები და ამ არეალში *B. anthracis*-ის გავრცელების შეზღუდვაზე სახელმწიფო საზღვრების გავლენის შესახებ.

ზოგადად, ნებისმიერ განშტოებაში უფრო ძველი საკვანძო წერტილის წარმომადგენლებს აქვთ მასშტაბური გეოგრაფიული გავრცელების უდიდესი პოტენციალი. მართლაც, 52-G განშტოების ერთ-ერთი ბაზალური ქვეჯგუფის- A.Br.028 წარმომადგენლებს შორის არიან შტამები, რომლებიც ცირკულირებენ და იზოლირებული არიან ქვეყნის უმეტეს რეგიონებში (სურათი 20, პანელი B და C). თუმცა, თითოეული ჯგუფის წარმომადგენელი შტამების შემდგომი სექვენირების გარეშე, შეუძლებელია ფილოგენეტიკური ტოპოლოგიის განსაზღვრა ისევ და ისევ შტოების კოლაფსის გამო. ასე მაგალითად, A.Br.028 ქვეჯგუფში განთავსდა თითქმის ყველა რეგიონიდან გამოყოფილი იზოლატების 64% (173 ნიმუში) რაც ამ გენოტიპის ფართო გავრცელებაზე მეტყველებს, თუმცა მეორეს მხრივ, A.Br.030 - A.Br.033 ქვეჯგუფებში შემავალი ჯილეხის შტამების ცირკულაცია დადასტურდა მხოლოდ ქვეყნის სამხრეთ-აღმოსავლეთ ნაწილში (სურათი 20, პანელი C), რაც ცალსახად მიგვითითებს გავრცელების გარკვეულ ლოკალიზებაზე.

აღნიშნული ნაშრომი ასახავს დამატებით გენეტიკურ მრავალფეროვნებას Aust94 ჯგუფში და გვიჩვენებს, რომ ის გეოგრაფიულად მკვეთრად გადანაწილებულია მჭიდროდ დაკავშირებულ იზოლატთა ჯგუფთან, რომლის გავრცელება კვლევის ამ ეტაპზე ნანახია საქართველოსა და თურქეთის რეგიონებში და მათ ირგვლივ. საქართველოში კი ვლინდება ერთი კონკრეტული გენოტიპის გეოგრაფიული ლოკალიზაციის შემთხვევა, რაც მიგვითითებს იმაზე, რომ ჯილეხის მთელ ქვეყანაში ფართო გავრცელების მიუხედავად, მისი ამჟამინდელი დისპერსია შესაძლოა იყოს შეზღუდული.

დკსჯეც-ის და ყარსის უნივერსიტეტის, თურქეთი, ერთობლივი სამეცნიერო პროექტის ფარგლებში ოცდაათი თურქული და ოცდაათი ქართული იზოლატის MLVA-25 და SNP გენოტიპირების შედეგად მიღებული მონაცემები მიგვითითებს, რომ ამ ორი ქვეყნის შტამები მიეკუთვნება Aust94 განშტოებას. ამასთან ერთად, აღნიშნა მინიმალური განსხვავება ყარსის შტამებს შორის; ოცდაათი შტამი გადანაწილდა ქართული

განშტოების სამ ქვეჯგუფში, აქედან 18 იზოლატი განეკუთვნა A.Br.026 ქვეჯგუფს, 10 იზოლატი - A.Br.028 და მხოლოდ ორი მოხვდა A.Br.029 ქვეჯგუფში.

MLVA-25 გენოტიპირების შედეგების თანახმად, ოცდაათი თურქული შტამიდან ყველა მიეკუთვნა ორ MLVA კლასტერს (A და B). ჯგუფი A უფრო მრავალფეროვანია, ვიდრე ჯგუფი B. ჩვენი შედეგების მიხედვით, *B. anthracis* შტამები საქართველოდან და თურქეთის ჩრდილო-აღმოსავლეთ ნაწილიდან გენეტიკურად ურთიერთ-დაკავშირებულია. *B. anthracis* გლობალური გენეტიკური პოპულაციური სტრუქტურა მიგვითითებს, რომ ადამიანთა აქტივობებმა შეასრულა მთავარი როლი აღნიშნული ბაქტერიის პროლიფერაციასა და გავრცელებაში. *B. anthracis* -ის ჯგუფი A-ს დივერგენცია აღინიშნა ადამიანის ისტორიის იმ პერიოდში, რომელიც ხასიათდებოდა სოფლის მეურნეობის მასშტაბური განვითარებით. როდესაც ძუძუმწოვართა მოშინაურება და მეცხოველეობა გასცდა ევრაზიისა და ჩრდილოეთ აფრიკის ცენტრების საზღვრებს, დაიწყო ცხოველთა ტრანსპორტირება დიდი სავაჭრო გზებით, როგორც იყო აბრეშუმის გზა - საქართველოსა და აღმოსავლეთ თურქეთის გავლით.

ითვლება რომ *B. anthracis* გენეტიკური ჰომოგენურობის მაღალი ხარისხით ხასიათდება, რაც ართულებს ნიმუშების ერთმანეთისგან განსხვავებას. გენეტიკური ჰომოგენურობა განპირობებულია სპორების თვითგადარჩენის მაღალი უნარით, რომელიც *B. anthracis*-მა გამოიმუშავა ევოლუციის მანძილზე. ქართული და თურქული *B. anthracis* -ის გენეტიკური ჰომოგენურობა, სავარაუდოდ, წარმოადგენს დროთა განმავლობაში საქართველო-თურქეთის საზღვრის გავლით პათოგენის მიგრაციის შედეგს. ბოლო დროს, ადამიანებში ჯილეხის შემთხვევები გაიზარდა საქართველოში, თუმცა არა - მის მოსაზღვრე ყარსის რეგიონში. ფაქტი, რომ ერთი ჯგუფის წარმომადგენელი ერთმანეთთან მჭიდროდ დაკავშირებული შტამები, გავრცელებულია ორივე რეგიონში, ადასტურებს იმას, რომ ადამიანებში დაავადების სხვადასხვაგვარი მიმდინარეობა გამოწვეულია სოფლის მეურნეობისა და სოციალური პრაქტიკის და არა - პათოგენის ვირულენტობის სხვადასხვაობით.

ორივე ერთად, SNP და MLVA მეთოდები ურთიერთშემავსებელ შედეგებს იძლევა: SNP ათავსებს იზოლატებს ფილოგენეტიკურ განშტოებებში და ქვეჯგუფებში, ხოლო MLVA

განსაზღვრავს ამ ქვეჯგუფებში შემავალი შტამების დამატებით გენეტიკურ პროფილებს. ზოგადად, SNP მუტაციების მთლიანი გენომების შედარების გზით აღმოჩენას გაცილებით მეტი გარჩევადობის უნარი აქვს, ვიდრე სხვა გენოტიპირების მეთოდებს, თუმცა უნდა აღინიშნოს ისიც, რომ მაგალითად MLVA-ს მთლიანი გენომის სექვენირების პროცესთან შედარებით, საკმაოდ მოკლე დროში შეუძლია რამოდენიმე მაღალპოლიმორფული უბნის ტიპირებით გენოტიპების გამოვლენა და ინფექციის წყაროს დადგენა; ამ უკანასკნელის ნათელი მაგალითი კი აღწერილია აღნიშნულ ნაშრომში, როდესაც 2008 წლის გარდაბნის სამი (კლინიკური, გარემო და პირუტყვის) შემთხვევის დაკავშირება მოხდა ერთმანეთთან.

გაზრდილი ხელმისაწვდომობა გენომის სრულ სექვენირებასა და ერთ-ნუკლეოტიდურ პოლიმორფიზმზე დაფუძნებულ გენოტიპირებაზე, გვთავაზობს როგორც მაღალ გარჩევადობას, ასევე ზუსტ ფილოგენეტიკურ ინფორმაციას; ამასთან კომბინაციაში, ფილოგენეტიკურ კვლევებში MLVA გენოტიპირების მეთოდის ჩართვა საშუალებას გვაძლევს მოკლე დროში რამოდენიმე მაღალპოლიმორფული უბნის ტიპირებით გამოვავლინოთ მეტი გენეტიკური პროფილი ძირითად ფილოგენეტიკურ ჯგუფებს შიგნით.

დასკვნები

სხვადასხვა მოლეკულური მეთოდების გამოყენებით გენეტიკურად დახასიათებულია დაავადებათა კონტროლისა და საზოგადოებრივი ჯანმრთელობის ეროვნული ცენტრის კოლექციაში არსებული *B. anthracis* 272 შტამი:

- ყველა ქართული, ისევე როგორც კვლევაში გამოყენებული ჯილხის თურქული შტამები, კანონიკური SNP გენოტიპირების შედეგების თანახმად განეკუთვნენ *B. anthracis* A ჯგუფის Aust94 SNP განშტოებას
- SNP გენოტიპირებამ მსოფლიო ფილოგენეტიკურ რუქაზე გამოავლინა ახალი, ქართული იზოლატებისთვის სპეციფიკური განშტოება, რომელშიც რვა ქართული ქვეჯგუფი გაერთიანდა

- შემუშავდა და დაინერგა ქართული შტამებისთვის სპეციფიკური SNP გენოტიპირების პანელი, რომელიც MLVA და სხვა თანამედროვე მოლეკულური ტიპირების მეთოდებთან ერთად, ქვეყანაში ჯილხის გამომწვევის წყაროს დადგენისაკენ მიმართულ სამუშაოებშია გამოყენებული
- საქართველოში პირველად გახდა ხელმისაწვდომი ჯილხის შტამების სრული გენომური სექვენირება. დღეის მდგომარეობით, სექვენირებულია და გაანალიზებულია საქართველოში იზოლირებული *B. anthracis* 13 იზოლატი.
- სრულმა გენომურმა სექვენირებამ (WGS) და SNP ტიპირებამ ქართულ შტამებს შორის გამოავლინა ერთმანეთისგან გეოგრაფიულად სრულიად განცალკევებული და გენეტიკურად დაშორებული ორი ფილოგენეტიკური ჯგუფი - Aust94 და TEA
- SNR გენოტიპირების მეთოდით კვლევის შედეგად ქართული შტამებით დაკომპლექტებულ SNP ჯგუფებში გამოვლინდა დამატებითი გენეტიკური პროფილები; აღნიშნულის გათვალისწინებით SNR/SNP მეთოდების კომბინაციით კვლევა გარჩევადობის მეტ საშუალებას იძლევა
- აღნიშნულმა ნაშრომმა მოგვცა მეტი ინფორმაციის მიღების საშუალება რეგიონში ჯილხის გავრცელების შესახებ, რაც თავისმხრივ თვალსაჩინოს ხდის მსოფლიოში ჯილხის გავრცელების მექანიზმებს და ტენდენციებს
- სასოფლო-სამეურნეო აქტივობებისა და პირუტყვის მიგრაციის პროცესების გათვალისწინებით, გამოიკვეთა მეზობელი ქვეყნების ტერიტორიაზე გავრცელებული ჯილხის შტამების შესწავლის აუცილებლობაც

6 ნაშრომის ინგლისურენოვანი რეზიუმე

Ekaterine Khmaladze

Molecular Genotyping and Phylogenetic Analysis of *B. anthracis* Strains Isolated in Georgia,

PhD Thesis

Summary

Introduction

Fighting against anthrax is considered to be one of the priorities for public health/epidemiological surveillance not only in Georgia, but also in the whole world. Due to the high virulence and ability to cause death, as well as spore formation in the environment and capacity to maintain spore viability in the soil during decades, *B. anthracis* was assigned to the especially dangerous pathogens, bio threat agent A.

High mortality rates of animals in the areas endemic to anthrax may cause weakening of the local agriculture sector and reduce the population's livelihood to some extent. Strengthening prevention, detection and response to the public health hazards, such as anthrax, becomes more and more important for endemic countries, in order to develop their capacity to meet the requirements of the International Health Regulations (IHR) and Global Health Security Agenda (GHSA) (2005).

Anthrax is an endemic disease in Georgia. The cases in humans and animals are found in all regions of the country with varied distribution intensity. Over the past 2-3 years, there has been a tendency to decrease human morbidity in the country, which is related to the implementation of an animal immunization program against anthrax. However, regulations regarding slaughtering / processing of sick animals and arranging their graves have not been fully resolved yet, which still remains a high-risk factor for developing anthrax in humans.

In the framework of the epidemiological surveillance program of especially dangerous pathogens, L. Sakvarelidze National Centre for Disease Control and Public Health (NCDC) continuously ensures full monitoring of natural foci and clinical dispersion of the disease.

Aim of the study

Genotyping and phylogenetic analysis of archival *B. anthracis* strains from the NCDC live culture repository and bordering countries was the main aim of this PhD thesis.

Objectives

- Develop modern genotyping assays (Single-Nucleotide Polymorphisms – SNP, Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis - MLVA and Whole Genome-Sequencing - WGS) for rapid typing of newly isolated *Bacillus anthracis* strains as well as clinical and environmental samples
- Phylogenetically characterize *Bacillus anthracis* isolates from the National collection of Bacteria and Viruses of NCDC of Georgia
- To place the Georgian *Bacillus anthracis* isolates into an existing global phylogeographic framework
- Identify new populations among *Bacillus anthracis* strains isolated from Georgia

Practical Value of the Study

The research, carried out in the framework of the thesis, allowed us to observe the circulation of the pathogen between environment and human. At the same time, practical implementation of the above-mentioned methods made it possible to timely detect the source of infection – newly isolated *B. anthracis* strains, as well as determine the origination of clinical and environmental samples and their genetic interrelation. According to the issues named earlier in the thesis, the described studies promote improvement of epidemiological surveillance of anthrax in the country and more efficient realization of the program. Strengthening the

epidemiological surveillance of anthrax will play an extremely important role in decreasing the morbidity rate in the population and addressing general health issues.

Materials and Methods

A total of 272 *B. anthracis* archival strains from the NCDC live culture repository and 30 Turkish *B. anthracis* DNAs isolated from the Kars region (in scope of Georgia – Turkey collaboration) were included in this study;

For PCR confirmation, SNP and MLVA-25 genotyping, DNA was isolated using heat soak method; for Whole Genome Sequencing (WGS) genomic DNA extraction of selected strains was performed with chlorophorm extraction method; for culture confirmation real-time PCR (*B. anthracis* DetectionKit Target1, Target 2, Freeze-Dried Reagents, BioFire Defense, LLC).

For molecular typing of *B. anthracis* strains Single Nucleotide Polymorphism (SNP) and Multi Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) techniques were applied. Georgian-specific SNP discovery was performed by comparison of available and newly sequenced Georgian strains in collaboration with Northern Arizona University (NAU). From discovered SNPs specific for Georgian isolates, SNP genotyping panel was developed - PCR assays were designed for using both, Melt-MAMA (Mismatch Amplification Mutation Assay) real-time and gel platforms.

In order to study genetic modifications in this organism, 10 *B. anthracis* strains were chosen for Whole Genome Sequencing from different identified *B. anthracis* SNP subclades. WGS was carried out on Illumina, MiSeq platform at R.G. Lugar Center for Public Health Research at NCDC. To expand knowledge about the scope of genetic diversity within *B. anthracis* spread in Georgia, after WGS data collection Single Nucleotide Repeat analysis (SNR), Multilocus Sequence Typing (MLST) and study of Protective Antigen (PA) genotypes was performed.

Results and discussions

Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)

26 putative SNPs specific to the Georgian lineage were identified in the whole genome sequence analysis and were incorporated into melt-MAMA genotyping assays. GC-rich tails were used on one allele specific primer what made them applicable to use for both SYBR Green and Gel Assays. These assays were used to screen 272 *B. anthracis* isolates from the NCDC collection. As a result, a new sub-lineage within the A.Br.013/015 clade that contained 272 Georgian isolates was discovered. Within this new European/Asian juncture sub-lineage, eight new genetic subgroups were identified that are spread on geographically distinct west and east territories of Georgia. After quality control and evaluation of PCR reactions, one assay per SNP group was selected. A total of eight SNP assays were considered for newly generated SNP genotyping panel (A.Br.026; A.Br.027; A.Br.028; A.Br.029; A.Br.030; A.Br.031; A.Br.032 and A.Br.033).

Genotyping of *B. anthracis* strains isolated in the Kars region of Turkey using canonical SNPs as well as a newly discovered Georgian SNP panel placed all Turkish isolates in Aust94 lineage and among three Georgian SNP subgroups - A.Br.026; A.Br.028 and A.Br.029. This finding is consistent with the idea that this new genetic group may be geographically restricted to border regions of the European/Asian continents. This restricted geographic distribution, as well as the high levels of genetic diversity within the lineage, is consistent with a relatively older origin and localized differentiation. In addition, the molecular SNP signatures that mark the geographically restricted European/Asian juncture sub-lineage and their genetic subgroups provide with the capability to trace *B. anthracis* that originate from regions along the European/Asian continents.

Multi Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis (MLVA)

According to the BA-MLVA-25 genotyping results, 30 Georgian *B. anthracis* strains generally showed more diversity within SNP subgroups, but structured in multiple small MLVA clusters. Interestingly, in one of the clusters the same MLVA genotype was found in strains isolated from patient, animal and soil from the same area, what provides a direct evidence of the source of

infection. As for strains from Turkey, all 30 isolates belonged to two clusters (A and B) with thirteen MLVA genotypes. Cluster A is more diverse than cluster B, which could be explained by the relatively small sample size and different sample locations. Our results suggest that *B. anthracis* strains originating from Georgia and the northeastern part of Turkey are genetically interrelated, which could be explained by the geographic proximity of the countries. When both data compared there were two clear clusters by the origin of strains, Turkey's cluster and Georgia's cluster. It suggested that *B. anthracis* might transmit at relatively low level and have a relatively stable genome over time.

MLVA genotyping is established in Georgia and along with other molecular techniques it will enhance current surveillance and detection capabilities and will be in routine use to track sources of infection.

Whole Genome Sequencing – WGS

A comparison of virulence factors and genes within Georgian *B. anthracis* isolates associated with different SNP subclades showed that chromosomal genes that are known to affect virulence as well as genes located on plasmids, appeared to be conservative, while pXO1 and pXO2 plasmid composition revealed different profiles and separated strains into two canSNP groups: A.Br.013/015 groups (Aust94) and A.Br.008/009 (TEA). In addition, 28 putative SNPs specific to the Georgian isolates were identified based on new WGS data; newly discovered SNPs will be converted into the Melt-MAMA and will be added to already established SNP genotyping assay panel at NCDC. Two very distinct and relatively distant populations of *B. anthracis* were discovered across the Georgian landscape. Within the small geographic scale of Georgia, the identification of two distinct and genetically distant populations of *B. anthracis* suggests that Georgia is the site of multiple waves of *B. anthracis* dispersals from different origins.

Study of Protective Antigen (PA) genotypes and phenotypes indicate that the *pag* data are consistent with chromosomal diversity in SNP groups. Although sequencing of *pagA* results in limited numbers of subtypes, it does have the added benefit of determining if the *pagA* gene has been altered or engineered. MLST analysis was unable to identify polymorphisms in the studied

B. anthracis strains; all isolates had the same sequence type, and were identified as Sequence Type (ST1) 1.

Our study demonstrated that SNR analysis was able to discriminate strains within the same canSNP group. These two combined data sets (canSNP/SNR) provided greater resolution and can be applied in tracking outbreaks as well as in forensic studies.

Conclusions

- 272 strains of *B. anthracis* stored in the National Center for Disease Control and Public Health (NCDC) collection are genetically characterized by various molecular methods.
- According to the results of canonical SNP genotyping, all Georgian, as well as Turkish *B. anthracis* strains were assigned to the *B. anthracis* group A, particularly Aust94 SNP lineage.
- SNP genotyping revealed a new lineage on the global phylogenetic map, which was specific to Georgian isolates and consisted of eight new Georgian subgroups.
- There was developed and implemented a Georgian strain-specific SNP genotyping panel, which, along with MLVA and other modern molecular typing methods, will be used in routine works for detection of the source of anthrax in the country.
- For first time in Georgia Whole-Genome Sequencing of *B. anthracis* strains became available and was carried out. Currently, there are a total of 13 sequenced *B. anthracis* strains, isolated in Georgia.
- Whole-Genome Sequencing (WSG) and SNP-typing revealed two geographically separated and genetically distinct phylogenetic groups among Georgian strains – Aust94 and TEA.
- SNR genotyping method revealed additional genetic profiles in SNP groups, containing Georgian strains; therefore, research using combination of SNR/SNP methods is characterized by higher resolution.
- This study allowed us to obtain more information regarding distribution of anthrax in the region, which makes the history, mechanisms and trends of its global dissemination obvious and expands them even further.
- Consideration of agricultural activities and animal migration revealed the necessity of studying *B. anthracis* strains, dispersed through the neighboring countries.

7 დანართები

7.1 დანართი 1 - კვლევაში გამოყენებული დესჯეც-ის კოლექციაში არსებული *B. anthracis* შტამების სრული აღწერა

შტამის #	შტამის იზოლაციის წელი	შტამის იზოლაციის ადგილი	შტამის იზოლაციის წყარო	Van Ert et al 2007 გამოქვეყნებული canSNP ჯგუფი	Birdsell et al. 2012 გამოქვეყნებული canSNP ჯგუფი	ქართული canSNP ჯგუფი
261-G	2009	სამტრედია	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.026/027
1162-G	2002	ახალქალაქი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
2345-G	2002	წყალტუბო	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
2346-G	2003	წყალტუბო	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
367-G	2001	ქუთაისი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
368-G	2001	ქუთაისი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
392-G	2001	რუსთავი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
405-G	2001	ზუგდიდი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
411-G	2001	ქუთაისი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
4568-G	2004	გარდაბანი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
5040-G	2004	წყალტუბო	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
5041-G	2004	სენაკი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
5042-G	2004	წყალტუბო	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
5043-G	2004	წყალტუბო	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
5044-G	2004	სენაკი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
6393-G	2006	სამტრედია	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
6394-G	2006	სამტრედია	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
6395-G	2006	სამტრედია	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
6396-G	2006	სამტრედია	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
6423-G	2006	წყალტუბო	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
6424-G	2006	წყალტუბო	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
6425-G	2006	წყალტუბო	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
6426-G	2006	სამტრედია	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
8222-G	1990	თბილისი	გარემო	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
8268-G	2007	სენაკი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
8269-G	2007	სენაკი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
8279-G	2007	ხონი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
8280-G	2007	ხონი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
8296-G	2007	ხონი	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
8298-G	2007	წყალტუბო	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
8309-G	2007	სენაკი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
8347-G	2007	თეთრიწყარო	გარემო	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
8374-G	2007	სენაკი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
8402-G	2007	ქუთაისი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
8500-G	1991	სოხუმი	გარემო	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
8668-G	1991	ახალგორი	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
8670-G	1992	სოხუმი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
8776-G	1992	გურჯაანი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
8777-G	1992	წყალტუბო	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
8778-G	1992	წყალტუბო	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
8779-G	1992	ჭიათურა	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
8887-G	1994	ქარელი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028

8893-G	1996	სამტრედია	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
8992-G	2008	ქუთაისი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
9064-G	2008	წალკა	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
9080-G	1998	გარდაბანი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
9630-G	2000	ახალქალაქი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
9681-G	2008	სამტრედია	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
A136	-	N/A	unknown	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.027/028
1028-G	2010	გარდაბანი	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1029-G	2010	გარდაბანი	გარემო	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1047-G	2010	ზესტაფონი	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
105-G	2009	წალკა	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
106-G	2009	წალკა	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
107-G	2009	წალკა	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
108-G	2009	რუსთავი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
109-G	2009	გარდაბანი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
110-G	2009	გარდაბანი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
111-G	2009	გარდაბანი	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
112-G	2009	წალკა	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
113-G	2009	წალკა	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1173-G	2010	ხოზი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1202-G	2010	გარდაბანი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1203-G	2010	თერჯოლა	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1211-G	2010	გარდაბანი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1212-G	2010	წალენჯიხა	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1213-G	2010	წალენჯიხა	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1218-G	2010	გარდაბანი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1230-G	2010	საგარეჯო	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1243-G	2010	ქედა	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1248-G	2010	ასპინძა	გარემო	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1251-G	2011	თერჯოლა	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1254-G	2011	დედოფლისწყარო	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1255-G	2011	დედოფლისწყარო	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1256-G	2011	დედოფლისწყარო	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1272-G	2011	გარდაბანი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1288-G	2011	გარდაბანი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1289-G	2011	გარდაბანი	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
130-G	2009	გარდაბანი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1310-G	2011	ახალქალაქი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1311-G	2011	გარდაბანი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
131-G	2009	გარდაბანი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1340-G	2011	თბილისი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1344-G	2011	ზესტაფონი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1345-G	2011	ზესტაფონი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1349-G	2011	საგარეჯო	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1350-G	2011	საგარეჯო	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1351-G	2011	საგარეჯო	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1352-G	2011	ბაღდათი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1353-G	2011	დმანისი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1358-G	2011	სენაკი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1359-G	2011	საგარეჯო	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1360-G	2011	საგარეჯო	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029

152-G	2009	რუსთავი	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1530/11-G	2011	ხობი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1531/11-G	2011	ხობი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1532/11-G	2011	ხობი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1533/11-G	2011	საგარეჯო	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1534/11-G	2011	თბილისი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1535/11-G	2011	ხობი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1536/11-G	2011	ქობულეთი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
153-G	2009	რუსთავი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1545/11-G	2011	თეთრიწყარო	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1546/11-G	2011	საგარეჯო	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1547/11-G	2011	გარდაბანი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1548/11-G	2011	ბოლნისი	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
154-G	2009	რუსთავი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
155-G	2009	რუსთავი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1574/11-G	2011	მესტია	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1575/11-G	2011	საგარეჯო	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1576/11-G	2011	რუსთავი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1585/11-G	2011	საგარეჯო	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1617/11-G	2011	გარდაბანი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1618/11-G	2011	გარდაბანი	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1631/11-G	2011	ზესტაფონი	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1998-G	2002	რუსთავი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
201-G	2009	რუსთავი	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
280-G	2009	სენაკი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
309-G	2009	ქუთაისი	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
310-G	2009	საგარეჯო	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
406-G	2001	ზუგდიდი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
4124-G	2003	ზუგდიდი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
4125-G	2003	ზუგდიდი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
4126-G	2003	ზუგდიდი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
4805-G	2004	თბილისი	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
4806-G	2004	თბილისი	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
5045-G	2004	სენაკი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
5046-G	2004	სენაკი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
5056-G	2004	გარდაბანი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
5064-G	2004	გარდაბანი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
5681-G	2005	თბილისი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
5682-G	2005	თბილისი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
5776-G	2005	თბილისი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
5899-G	2005	თიანეთი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
5900-G	2005	თიანეთი	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
5901-G	2005	თიანეთი	გარემო	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
5902-G	2005	თიანეთი	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
5903-G	2005	თიანეთი	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029

5919-G	2005	დუშეთი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
6341-G	2006	გარდაბანი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
7763-G	2007	ზესტაფონი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
8263-G	2007	კასპი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
8264-G	2006	ზესტაფონი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
8273-G	2007	სენაკი	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
830-G	2010	ფოთი	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
8888-G	1995	გარდაბანი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
8889-G	1996	გარდაბანი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
8903-G	1997	გარდაბანი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
8904-G	1997	რუსთავი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
8982-G	2008	ზესტაფონი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
89-G	2009	წალკა	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
9061-G	2008	თბილისი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
9062-G	2008	წალკა	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
9063-G	2008	წალკა	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
9065-G	2008	წალკა	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
9066-G	2008	წალკა	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
9067-G	2008	წალკა	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
9068-G	2008	სამტრედია	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
9074-G	2008	წალკა	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
9075-G	2008	თიანეთი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
907-G	2010	ზესტაფონი	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
90-G	2009	წალკა	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
9100-G	2008	ზესტაფონი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
9105-G	2008	ხობი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
9107-G	2008	გარდაბანი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
9129-G	2008	გარდაბანი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
9130-G	2008	გარდაბანი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
91-G	2009	წალკა	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
92-G	2009	წალკა	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
93-G	2009	წალკა	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
940-G	2010	გარდაბანი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
941-G	2010	გარდაბანი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
942-G	2011	გარდაბანი	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
9450-G	1999	ზესტაფონი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
9680-G	2008	რუსთავი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
9682-G	2008	სამტრედია	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
981-G	2010	საგარეჯო	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.028/029
1185-G	2010	მარნეული	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.029/030
1186-G	2010	მარნეული	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.029/030
1204-G	2010	ლაგოდეხი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.029/030
1242-G	2002	ზუგდიდი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.029/030
13390-G	2009	თბილისი	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.029/030
4166-G	2003	გარდაბანი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.029/030

4250-G	2003	გარდაბანი	გარემო	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.029/030
4300-G	2003	გარდაბანი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.029/030
4301-G	2004	გარდაბანი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.029/030
6150-G	2006	რუსთავი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.029/030
6670-G	2006	გარდაბანი	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.029/030
6672-G	2006	გარდაბანი	გარემო	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.029/030
6673-G	2006	გარდაბანი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.029/030
8275-G	2007	გარდაბანი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.029/030
8276-G	2007	გარდაბანი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.029/030
8277-G	2007	გარდაბანი	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.029/030
8295-G	2007	ხონი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.029/030
8981-G	2008	ზესტაფონი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.029/030
9084-G	2008	გარდაბანი	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.029/030
9085-G	2008	გარდაბანი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.029/030
9101-G	2008	ზესტაფონი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.029/030
9108-G	2008	თბილისი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.029/030
9677-G	2000	საგარეჯო	გარემო	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.029/030
1205-G	2010	ლაგოდეხი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.030/031
1206-G	2010	ლაგოდეხი	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.030/031
1207-G	2010	ლაგოდეხი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.030/031
1208-G	2010	ლაგოდეხი	გარემო	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.030/031
1209-G	2010	ლაგოდეხი	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.030/031
1210-G	2010	თბილისი	გარემო	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.030/031
3063-G	2003	გარდაბანი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.031/032
9896-G	2009	გარდაბანი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.031/032
13389-G	2009	გარდაბანი	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.032/033
3061-G	2003	გარდაბანი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.032/033
3062-G	2003	გარდაბანი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.032/033
349-G	2009	დედოფლისწყარო	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.032/033
350-G	2009	დედოფლისწყარო	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.032/033
351-G	2009	დედოფლისწყარო	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.032/033
50-G	2009	მარნეული	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.032/033
51-G	2009	მარნეული	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.032/033
8905-G	1997	გარდაბანი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.032/033
9099-G	2008	გარდაბანი	ნიადაგი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.032/033
9102-G	2008	გარდაბანი	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.032/033
9103-G	2008	გარდაბანი	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.032/033
9104-G	2008	გარდაბანი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.032/033
9442-G	1999	დედოფლისწყარო	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.032/033
9443-G	1999	გარდაბანი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.032/033
9894-G	2009	გარდაბანი	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.032/033
9895-G	2009	გარდაბანი	გარემო	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.032/033
9897-G	2009	გარდაბანი	ადამიანი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.032/033
52-G	2009	თბილისი	პირუტყვი	A.Br.Aus94	A.Br.013/015	A.Br.033

7.2 დანართი 2 - საერთაშორისო ჟურნალებში გამოქვეყნებული სტატიები

1. Khmaladze, E., Birdsell, D. N., Naumann, A. A., Hochhalter, C. B., Seymour, M. L., Nottingham, R., Pearson, T. (2014). Phylogeography of *Bacillus anthracis* in the Country of Georgia Shows Evidence of Population Structuring and Is Dissimilar to Other Regional Genotypes. *PLoS ONE*, 9(7), e102651.
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0102651>
2. Khmaladze, E., Dzavashvili, G., Chanturia, G., Nikolich, M. P., Chain, P. S. G., Johnson, S. L., & Imnadze, P. (2017). Ten Genome Sequences of Human and Livestock Isolates of *Bacillus anthracis* from the Country of Georgia. *Genome Announcements*, 5(19), e00256–17. <http://doi.org/10.1128/genomeA.00256-17>
3. Khmaladze E, Su W, Zghenti E, Buyuk F, Sahin M, Nicolich MP, et al. Molecular Genotyping of *Bacillus anthracis* Strains from Georgia and Northeastern Part of Turkey. *J Bacteriol Mycol*. 2017; 4(3): 1053. *J Bacteriol Mycol* - Volume 4 Issue 3 - 2017. ISSN : 2471-0172 | www.austinpublishinggroup.

7.3 დანართი 3 - საერთაშორისო კონფერენციებზე წარდგენილი მოხსენებები

1. *Phylogeography and molecular typing of Bacillus anthracis isolates endemic in the country of Georgia*, Medical Biodefense Conference, 2011, Munich, Germany
2. *Phylogeography of Bacillus anthracis Isolates from the Country of Georgia*, 10th ASM Biodefense and Emerging Diseases Research Meeting, February 26 - 29, 2012, Washington DC, USA
3. *Combined SNP and MLVA Subtyping of Bacillus anthracis strains from Georgia*, 11th ASM Biodefense and Emerging Diseases Research Meeting, February 25 - 27, 2013, Washington DC, USA
4. *Anthrax Surveillance System and Canonical SNP Typing of Bacillus anthracis Strains Isolated in the Country of Georgia 2009-2011*, 10th ASM Biodefense and Emerging Diseases Research Meeting, February 26 - 29, 2012, Washington DC, USA
5. *Real-Time PCR Detection and SNP Genotyping of Bacillus Anthracis strains Isolated During Human Anthrax Outbreaks occurred in 2012 in the Country of Georgia*, *The International Conference on Bacillus anthracis, B. cereus, and B. thuringiensis. 1-5 September, 2013, Victoria, Canada*
6. *Anthrax surveillance data of 2012 in Georgia*, 11th ASM Biodefense and Emerging Diseases Research Meeting, February 25 - 27, 2013, Washington DC, USA
7. *Whole Genome Sequencing of Ten Bacillus anthracis Strains from the Country of Georgia*, 12th ASM Biodefense and Emerging Diseases Research Meeting, January 27 - 29, 2014, Washington DC, USA
8. *NGS Data Analysis of Bacillus anthracis and Francisella tularensis - Comparison of Two Bioinformatic Tools, Sequencing, Finishing, and Analysis in the Future Meeting*, May 27-29, 2015 Santa Fe, NM, USA
9. *Genetic Characterization of Bacillus anthracis Strains From Georgia*, 7th International Bacillus ACT meeting, October 27-31, 2015 New Dehli, India

10. *Molecular Genotyping of Bacillus anthracis Isolates from Kars province of Turkey, ASM Biodefense and Emerging Diseases Research Meeting, February 8 - 10, 2016, Arlington, Virginia, USA*
11. *Bacillus anthracis SNP Genotype similarities: Isolates from Georgia and Kars Turkey, Bacillus ACT[™] meeting, October 1-5, 2017, Victoria, Canada*
12. *Genotyping of Georgian Archival Bacillus anthracis strains by 25-loci Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeats Analysis (MLVA-25), ASM Biodefense and Emerging Diseases Research Meeting, February 6 - 8, 2017, Washington DC, USA*
13. *Characterization of Genetic Diversity of Bacillus anthracis Strains from Georgia using High Resolution Typing Systems , Bacillus ACT, October 1-5, 2017, Victoria, British Columbia, Canada*
14. *Genetic Characterization of Georgian Bacillus anthracis strains Isolated from Soil in 2016, ASM Microbe, June 1–5, 2017 New Orleans, USA*
15. *Molecular characterization of Bacillus anthracis isolates from newly discovered foci in Georgia, ASM Biothreats Conference, February 11-14, 2018, Baltimore, MA USA.*

8 გამოყენებული ლიტერატურა

Abramova, F. A., Grinberg, L. M., Yampolskaya, O. V., & Walker, D. H. (1993). Pathology of inhalational anthrax in 42 cases from the Sverdlovsk outbreak of 1979. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 90(6), 2291–2294.

Albrink WS, Brooks SM, Biron RE, Kopel M. Human inhalation anthrax. A report of three fatal cases. Am J Pathol. 1960;36:457–471.

Anon. (1967). [Method of aerosol immunization in specific prevention of infectious diseases]. Materiali 6-oi mezhinstitutskoi konferentsiyi pamyati I I Mechnikova, Moscow, 11–13 May 1967. Moscow, Meditsina. (In Russian.)

Angiuoli SV, Gussman A, Klimke W, Cochrane G, Field D, Garrity GM, Kodira CD, Kyrpides N, Madupu R, Markowitz V, Tatusova T, Thomson N, White O. 2008. Toward an online repository of standard operating procedures (SOPs) for (meta) genomic annotation. Omics 12:137–141. doi:10.1089/omi.2008.0017.

Babamahmoodi F, Aghabarari F, Arjmand A, Ashrafi GH. Three rare cases of anthrax arising from the same source. J Infect. 2006;53:175–179

Banerjee, D., Chakraborty, B., & Chakraborty, B. (2017). Anthrax: Where Margins are Merging between Emerging Threats and Bioterrorism. Indian Journal of Dermatology, 62(5), 456–458. http://doi.org/10.4103/ijd.IJD_378_17

Bell JH. On Anthrax and Anthracæmia in Wool-Sorters, Heifers, and Sheep . Br Med J. 1880;2:656–657.

*Bell, C. A., Uhl, J. R., Hadfield, T. L., David, J. C., Meyer, R. F., Smith, T. F., & Cockerill III, F. R. (2002). Detection of *Bacillus anthracis* DNA by LightCycler PCR. Journal of Clinical Microbiology, 40(8), 2897–2902. <http://doi.org/10.1128/JCM.40.8.2897-2902.2002>*

Beyer, W., Bellan, S., Eberle, G., Ganz, H. H., Getz, W. M., Haumacher, R., ... Turnbull, P. C. B. (2012). *Distribution and Molecular Evolution of Bacillus anthracis Genotypes in Namibia*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(3), e1534. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001534>

Biddle, W. 1995. p. 20-22. In *A field guide to germs*.

Birdsell DN, Pearson T, Price EP, Hornstra HM, Nera RD, et al. . (2012) *Melt Analysis of Mismatch Amplification Mutation Assays (Melt-MAMA): A Functional Study of a Cost-Effective SNP Genotyping Assay in Bacterial Models*. *Plos One* 7.

Brachman PS. *Inhalation anthrax*. *Ann N Y Acad Sci*. 1980;353:83–93

Brook I. *The prophylaxis and treatment of anthrax*. *Int J Antimicrob Agents*. 2002;20:320–325.

Château A, Willem van Schaik, Anne Six, Willy Aucher, and Agnès Fouet. *CodY regulation is required for full virulence and heme iron acquisition in Bacillus anthracis*. *The FASEB Journal* 2011 25:12, 4445-4456

Chatterjee A¹, O'Brian MR¹. *Rapid evolution of a bacterial iron acquisition system*. *Mol Microbiol*. 2018 Jan 30. doi: 10.1111/mmi.13918.

Centers for Disease Control and Preventio (CDC). *Gastrointestinal Anthrax after an Animal-Hide Drumming Event --- New Hampshire and Massachusetts, 2009*. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)*. 59 (28): 872–877. July 2010.

Cimons, M. 1998. *DoD move forward with anthrax vaccination program*. *Am. Soc. Microbiol. News* 64: 128-129

Compton, J (ed.). 1987. p. 354-361. In *Military Chemical and Biological Agents: chemical and toxicologic properties*.

Colorado Serum Company. *Anthrax Live Spore Vaccine Information Leaflet*.

Coulson, N., M. Fulop, R. Titball. 1994. *Bacillus anthracis* protective antigen, expressed in *Salmonella typhimurium* SL3261, affords protection against anthrax spore challenge. *Vaccine*. 12: 1395-1401.

Daw, Daniel (30 October 2014). "Anthrax outbreak causes quarantine of Indian village". *BioPrep Watch*. Chicago, Illinois. Retrieved 23 March 2015.

Del Giudice P. Cutaneous complications of intravenous drug abuse. *Br J Dermatol*. 2004;150:1–10.

Dixon TC, Meselson M, Guillemin J, Hanna PC. Anthrax. *N Engl J Med*. 1999;341:815–826.

Dirckx JH. Virgil on anthrax. *Am J Dermatopathol*. 1981;3:191–195.

Donald A. Henderson, Thomas V. Inglesby, Tara O'Toole, John G. Bartlett, Thomas V. Inglesby, Luciana Borio; Management of Anthrax, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 35, Issue 7, 1 October 2002, Pages 851–858, <https://doi.org/10.1086/341902>

Dragon DC, Rennie RP. The ecology of anthrax spores: tough but not invincible. *Can Vet J*. 1995;36:295–301

Durmaz R, Doganay M, Sahin M, Percin D, Karahocagil MK, et al. (2012) Molecular epidemiology of the *Bacillus anthracis* isolates collected throughout Turkey from 1983 to 2011. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31: 2783–2790

Dutz, W., E. Kohout-Dutz. 1981. Anthrax. *Int. J. Derm.* 20: 203-206.

Espy, M. J., Uhl, J. R., Sloan, L. M., Buckwalter, S. P., Jones, M. F., Vetter, E. A., ... Smith, T. F. (2006). Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(1), 165–256. <http://doi.org/10.1128/CMR.19.1.165-256.2006>

- Eremenko EI, Ryazanova AG, Tsygankova OI, Tsygankova EA, Buravtseva NP, et al. (2012) Genotype diversity of *Bacillus anthracis* strains isolated from the Caucasus region. *Molecular Genetics Microbiology and Virology* 27: 74–78
- Fasanella, A. (2013). *Bacillus anthracis*, virulence factors, PCR, and interpretation of results. *Virulence*, 4(8), 659–660. <http://doi.org/10.4161/viru.26517>
- Goel, A. K. (2015). Anthrax: A disease of biowarfare and public health importance. *World Journal of Clinical Cases : WJCC*, 3(1), 20–33.
- Goossens PL. *Animal models of human anthrax: the Quest for the Holy Grail. Mol Aspects Med.* 2009;30:467–480
- Grinberg LM, Abramova FA, Yampolskaya OV, Walker DH, Smith JH. Quantitative pathology of inhalational anthrax I: quantitative microscopic findings. *Mod Pathol.* 2001;14:482–495.
- Garcia AG, Jimenez RR. *Bacillus anthracis meningitis. N Engl J Med.* 1999;341:814
- Gürçan, Ş., Akata, F., Kuloğlu, F., Erdoğan, S., & Tuğrul, M. (2005). Meningitis Due to *Bacillus Anthracis*. *Yonsei Medical Journal*, 46(1), 159–160. <http://doi.org/10.3349/ymj.2005.46.1.159>
- Guidi-Rontani, C., Pereira, Y., Ruffie, S., Sirard, J.-C., Weber-Levy, M. and Mock, M. (1999), Identification and characterization of a germination operon on the virulence plasmid pXOI of *Bacillus anthracis*. *Molecular Microbiology*, 33: 407–414. doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01485.
- Green BD, Battisti L, Koehler TM, Thorne CB, Ivins BE. Demonstration of a capsule plasmid in *Bacillus anthracis*. *Infect Immun.* 1985;49:291–7.
- Hanczaruk, M., Reischl, U., Holzmann, T., Frangoulidis, D., Wagner, D. M., Keim, P. S...Grass, G. (2014). Injectional Anthrax in Heroin Users, Europe, 2000–2012. *Emerging Infectious Diseases*, 20(2), 322–323. <https://dx.doi.org/10.3201/eid2002.120921>

- Hilleman, M. 2002. Overview: cause and prevention in biowarfare and bioterrorism. *Vaccine*. 20: 3055-3067
- Holty JE, Kim RY, Bravata DM. Anthrax: a systematic review of atypical presentations. *Ann Emerg Med*. 2006;48:200–211
- Holty JE, Bravata DM, Liu H, Olshen RA, McDonald KM, Owens DK. Systematic review: a century of inhalational anthrax cases from 1900 to 2005. *Ann Intern Med*. 2006;144:270–280.
- Hugh-Jones M, Blackburn J. The ecology of *Bacillus anthracis*. *Mol Aspects Med*. 2009;30:356–67.
- Hicks, C. W., Sweeney, D. A., Cui, X., Li, Y., & Eichacker, P. Q. (2012). An overview of anthrax infection including the recently identified form of disease in injection drug users. *Intensive Care Medicine*, 38(7), 1092–1104.
- Helgason E, Tourasse NJ, Meisal R, Caugant DA, Kolsto AB. Multilocus sequence typing for bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70:191–201. doi:10.1128/AEM.70.1.191-201.2004
- Inglesby TV, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, Friedlander AM, Hauer J, McDade J, Osterholm MT, O'Toole T, Parker G, Perl TM, Russell PK, Tonat K, for the Working Group on Civilian Biodefense. Anthrax as a Biological Weapon Medical and Public Health Management. *JAMA*. 1999;281(18):1735–1745. doi:10.1001/jama.281.18.1735
- Ibrahim KH, Brown G, Wright DH, Rotschafer JC. *Bacillus anthracis*: medical issues of biologic warfare. *Pharmacotherapy*. 1999;19:690–701
- Ivins, B., S. Welkos. 1988. Recent advances in the development of an improved human anthrax vaccine. *Eur. J. Epidem*. 4: 12-19.
- Ivins, B. 1988. The search for a new-generation human anthrax vaccine. *Clin. Immun. Newsletter* 9: 30-32.

Ivins, B., P. Fellows, G. Nelson. 1994. Efficacy of a standard human anthrax vaccine against *B. anthracis* spore challenge in guinea pigs. *Vaccine* 12: 872-874.

Jernigan DB; Raghunathan PL; Bell BP; Brechnert R; Bresnitz EA; Butler JC; Cetron M; et al. (October 2002). "Investigation of Bioterrorism-Related Anthrax, United States, 2001: Epidemiological Findings". *Emerging Infectious Diseases*. 8 (10). doi:10.3201/eid0810.020353

Jamie WE. Anthrax: diagnosis, treatment, prevention. *Prim Care Update Ob Gyns*. 2002;9:117–121

Kasradze, A., Echeverria, D., Zakhshvili, K., Bautista, C., Heyer, N., Imnadze, P., & Mitrskhulava, V. (2018). Rates and risk factors for human cutaneous anthrax in the country of Georgia: National surveillance data, 2008–2015. *PLoS ONE*, 13(2), e0192031. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0192031>

Kate Hendricks Walters, Rita M. Traxler, Chung K. Marston, *CDC Travel Yellow Book, 2018*

Keim, P., Price, L. B., Klevytska, A. M., Smith, K. L., Schupp, J. M., Okinaka, R., ... Hugh-Jones, M. E. (2000). Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis Reveals Genetic Relationships within *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology*, 182(10), 2928–2936.

Keim P. & Smith K. L. *Bacillus anthracis* evolution and epidemiology. *Curr Top Microbiol Immunol* 271, 21–32 (2002)

Keim P, Van Ert MN, Pearson T, Vogler AJ, Huynh LY, et al. Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales. *Infect Genet Evol*. 2004;4:205–213

Kenefic LJ, Beaudry J, Trim C, Huynh L, Zanecki S, Matthews M, Schupp J, Van Ert M, Keim P. A high resolution four-locus multiplex single nucleotide repeat (SNR) genotyping system in *Bacillus anthracis*. *J Microbiol Methods*. 2008;73:269–272

Kurtz S, Phillippy A, Delcher A, Smoot M, Shumway M, et al. (2004) Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biology* 5: R12.

Khmaladze, E., Birdsell, D. N., Naumann, A. A., Hochhalter, C. B., Seymour, M. L., Nottingham, R., ... Pearson, T. (2014). Phylogeography of *Bacillus anthracis* in the Country of Georgia Shows Evidence of Population Structuring and Is Dissimilar to Other Regional Genotypes. *PLoS ONE*, 9(7), e102651. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0102651>

Khmaladze E, & W, Su & E, Zghenti & F, Buyuk & Sahin, Mitat & MP, Nicolich & Baillie, Les & Obiso, Richard & Kotorashvili, Adam. (2017). Molecular Genotyping of *Bacillus anthracis* Strains from Georgia and Northeastern Part of Turkey. *J Bacteriol Mycol. Volume 4*.

Khmaladze, E., Dzavashvili, G., Chanturia, G., Nikolich, M. P., Chain, P. S. G., Johnson, S. L., & Imnadze, P. (2017). Ten Genome Sequences of Human and Livestock Isolates of *Bacillus anthracis* from the Country of Georgia. *Genome Announcements*, 5(19), e00256–17. <http://doi.org/10.1128/genomeA.00256-17>

Koehler TM1. *Bacillus anthracis* genetics and virulence gene regulation. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2002;271:143-64.

Koehler, T., Z. Dai, M. Kaufman-Yarbray. 1994. Regulation of the *Bacillus anthracis* protective antigen gene: CO₂ and a trans-acting element activate transcription from one of two promoters. *J. Bacteriol.* 176: 586-595.

Koch R. Die Aetiologie der Milzbrand-Krankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte des *Bacillus anthracis*. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen.* 1876;2:277–310.

Kracalik I, Malania L, Tsertsvadze N, Manvelyan J, Bakanidze L, Imnadze P, Tsanova S, Blackburn JK. 2014. Human cutaneous anthrax, Georgia 2010–2012. *Emerg Infect Dis* 20:261–264.

Kracalik IT, Malania L, Tsertsvadze N, Manvelyan J, Bakanidze L, Imnadze P, Tsanova S, Blackburn JK. 2013. Evidence of local persistence of human anthrax in the country of Georgia associated with environmental and anthropogenic factors. *PLoS Negl Trop Dis* 7:e2388.

Lebedinski VA (1971). [The inhalation (aerosol) method of vaccination]. Moscow, Meditsina. (In Russian; English translation published by Boston Spa, West Yorkshire.)

Lista F., Faggioni, G., Valjevac, S., Ciammaruconi V., Vaissaire J., Le Doujet C., et al. Genotyping of *Bacillus anthracis* strains based on automated capillary 25-loci MLVA. *BMC Microbiology*. 2006. 6, 33

Li PE, Lo CC, Anderson JJ, Davenport KW, Bishop-Lilly KA, Xu Y, Ahmed S, Feng S, Mokashi VP, Chain PSG. 2017. Enabling the democratization of the genomics revolution with a fully integrated web-based bioinformatics platform. *Nucleic Acids Res* 45:67–80

Liu, D.-L., Wei, J.-C., Chen, Q.-L., Guo, X.-J., Zhang, E.-M., He, L., ... Li, W. (2017). Genetic source tracking of an anthrax outbreak in Shaanxi province, China. *Infectious Diseases of Poverty*, 6, 14. <http://doi.org/10.1186/s40249-016-0218-6>

Marston, C. K., Gee, J. E., Popovic, T., & Hoffmaster, A. R. (2006). Molecular approaches to identify and differentiate *Bacillus anthracis* from phenotypically similar *Bacillus* species isolates. *BMC Microbiology*, 6, 22. <http://doi.org/10.1186/1471-2180-6-22>

Merabishvili, M., Natidze, M., Rigvava, S., Brusetti, L., Raddadi, N., Borin, S., ... Daffonchio, D. (2006). Diversity of *Bacillus anthracis* Strains in Georgia and of Vaccine Strains from the Former Soviet Union. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8), 5631–5636. <http://doi.org/10.1128/AEM.00440-06>

Michigan Department of Public Health. 1987. Anthrax vaccine adsorbed description leaflet.

Mizrahi, A (ed). 1990. Bacterial vaccines. p. 105-122. In *Advances in Biotechnological Processes*.

M MESELSON, J GUILLEMIN, M HUGH-JONES, A LANGMUIR, I POPOVA, A SHELOKOV, O YAMPOLSKAYA *The Sverdlovsk anthrax outbreak of 1979.* SCIENCE 18 NOV 1994 : 1202-1208

Mock M, Fouet A. 2001. Anthrax. *Annu Rev Microbiol* 55:647–671. doi:10.1146/annurev.micro.55.1.647.

Mesnager S, Tosi-Couture E, Gounon P, Mock M, Fouet A. *The capsule and S-layer: two independent and yet compatible macromolecular structures in Bacillus anthracis.* J Bacteriol. 1998;180:52–58.

Ogarkov VE, Gapochko KG (1975). [Aerosol infection]. Moscow, Meditsina. (In Russian.)

Pasteur L, Chamberland CF, Roux E. *Compte rendu sommaire des expériences faites à Pouilly-le-Fort, près Melun, sur la vaccination charbonneuse.* Comptes Rendus des séances De L'Académie des Sciences. 1881;92:1378–1383.

Plotkin SA, Brachman PS, Utell M, Bumford FH, Atchison MM. *An epidemic of inhalation anthrax, the first in the twentieth century: I. Clinical features.* 1960. Am J Med. 2002;112:4–12;

Powell AG, Crozier JE, Hodgson H, Galloway DJ. *A case of septicaemic anthrax in an intravenous drug user.* BMC Infect Dis. 2011;11:21.

Pezard, C., Weber, M., Sirard, J. C., Berche, P., & Mock, M. (1995). *Protective immunity induced by Bacillus anthracis toxin-deficient strains.* Infection and Immunity, 63(4), 1369–1372.

Pomerantsev AP et al. (1996). *Anthrax prophylaxis by antibiotic resistant STI -AR in combination with urgent antibiotic therapy.* Salisbury Medical Bulletin, 87S:131–132.

Pearson T, Busch JD, Ravel J, Read TD, Rhoton SD, et al. (2004) *Phylogenetic discovery bias in Bacillus anthracis using single-nucleotide polymorphisms from whole-genome sequencing.* Proc Natl Acad Sci U S A 101: 13536–13541

Price EP, Seymour ML, Sarovich DS, Latham J, Wolken SR, et al. (2012) Molecular Epidemiologic Investigation of an Anthrax Outbreak among Heroin Users, Europe. *Emerging Infectious Diseases* 18: 1307–1313

Priest FG, Barker M, Baillie LWJ, Holmes EC, Maiden MCJ. Population structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. *J Bacteriol.* 2004;186:7959–7970. doi: 10.1128/JB.186.23.7959-7970.2004.

Price, L. B., Hugh-Jones, M., Jackson, P. J., & Keim, P. (1999). Genetic Diversity in the Protective Antigen Gene of *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology*, 181(8), 2358–2362.

Ross JM. The pathogenesis of anthrax following the administration of spores by the respiratory route. *J Pathol Bacteriol.* 1957;73:485–494.

Shadomy SV, Idrissi AE, Raizman E, Bruni M, Palamara E, Pittiglio C, et al. *Anthrax outbreaks: a warning for improved prevention, control and heightened awareness.* Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2016

Sweeney DA, Hicks CW, Cui X, Li Y, Eichacker PQ. Anthrax infection. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;184:1333–1341.

Sterne, M. 1939. The use of anthrax vaccine prepared from avirulent (unencapsulated) variants of *B. anthracis*. *Onderstepoort J. Vet. Sci. & Anim. Ind.* 13: 307-312.

Sterne, M. 1939. The immunization of laboratory animals against anthrax. *Onderstepoort J. Vet. Sci. & Anim. Ind.* 13: 313-317

Stepanov AS, Mikshis NI, Bolotnikova MF (1996). Role of chromosomally-encoded factors in virulence of *Bacillus anthracis* for mice and guinea-pigs. *Salisbury Medical Bulletin*, 87S:86–87.

Shlyakhov EN, Rubinstein E (1994). Human live anthrax vaccine in the former USSR. *Vaccine*, 12:727–730.

- Shlyakhov, E., E. Rubinstein, I. Novikov. 1997. Anthrax post-vaccinal cell-mediated immunity in humans: kinetics pattern. *Vaccine*. 15: 631-636.
- Sharma, M., P. Swain, A. Chopra, V. Chaudhory, Y. Singh. 1996. Expression and purification of anthrax toxin protective antigen from *Escherichia coli*. *Prot. Express. Purif*. 7: 33-38.
- Shlyakhov, E. 1970. Anthrax: biological and immunological principles of diagnosis and prevention. *J. Hyg., Epidem., Microbiol. & Immun.* 14: 464-468.
- Singh, Y., B. Ivins, S. Leppla. 1998. Study of immunization against anthrax with the purified recombinant protective antigen of *B. anthracis*. *Infect. Immun.* 66:3447-3448.
- Stephens AJ, Huygens F, Inman-Bamber J, Price EP, Nimmo GR, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* genotyping using a small set of polymorphisms. *J Med Microbiol.* 2006;55:43-51.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd ed: Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- The Guardian. "Anthrax outbreak triggered by climate change kills boy in Arctic Circle".
- Tess Owen, 1,500 reindeer dead, 40 humans hospitalized amid anthrax outbreak in Siberia". *VICE News*, 2016
- Turnbull, P. 1991. Anthrax vaccines: past, present and future. *Vaccine*. 9:533-539
- Thierry, S., Tourterel, C., Le Flèche, P., Derzelle, S., Dekhil, N., Mendy, C., ... Madani, N. (2014). 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*, 9(6), e95131. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0095131>
- Uchida I, Sekizaki T, Hashimoto K, Terakado N. Association of the encapsulation of *Bacillus anthracis* with a 60 megadalton plasmid. *J Gen Microbiol.* 1985;131:363-7.

United States Central Intelligence Agency. [Accessed 27 Jan 2012];The world factbook: field listing: illicit drugs. 2012 <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/fields/2086.html>

Van Ert, M. N., Easterday, W. R., Simonson, T. S., U'Ren, J. M., Pearson, T., Kenefic, L. J., ... Keim, P. (2007). Strain-Specific Single-Nucleotide Polymorphism Assays for the *Bacillus anthracis* Ames Strain . *Journal of Clinical Microbiology*, 45(1), 47–53. <http://doi.org/10.1128/JCM.01233-06>

Van Ert MN, Easterday WR, Huynh LY, Okinaka RT, Hugh-Jones ME, Ravel J, et al. Global genetic population structure of *Bacillus anthracis*. *PLoS One*. 2007;2:e461. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0000461>).

World Health Organization. *Anthrax in humans and animals*, 4th ed. Geneva: The Organization; 2008.

თ. კუხალაშვილი „ჯილების კერების საქართველოში“ გამომცემლობა „მერიდიანი“, თბილისი, 2007 წელი

ჯანდაცვის სამინისტროს (ჯილების მართვის პროტოკოლი, საქ-ს ჯანდაცვის სამინისტროს მიერ დამტკიცებული, 2015 წელი

Кухалашвили Т.Г.- Эпидемиологическая география сибирской язвы в грузии (1881-1970 гг.). Автореферат. Москва 1974 г. ст. 3-15.

Кухалашвили Т.Г., Ю.И. Дзедзисашвили – Атлас неблагополучных по сибирской язве пунктов в грузинской ССР. Тбилиси. 1976 г. ст. 3-154.