

А.Г.Рязанова, Е.И.Еременко, О.И.Цыганкова, Е.А.Цыганкова, А.Н.Куличенко

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОГО ТИПИРОВАНИЯ *BACILLUS ANTHRACIS* В РЕФЕРЕНС-ЦЕНТРЕ ПО МОНИТОРИНГУ ЗА ВОЗБУДИТЕЛЕМ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь

В работе представлены результаты молекулярного типирования *B. anthracis* в рамках деятельности Референс-центра по мониторингу за возбудителем сибирской язвы. Обобщен опыт использования генотипирования при проведении эпидемиологического расследования вспышек сибирской язвы. Отмечено, что MLVA-генотипирование с анализом от 8 до 25 VNTR-локусов при изучении штаммов *B. anthracis*, выделенных в Российской Федерации и на сопредельных территориях, позволяет проводить корректное сравнение генотипов с данными всемирной MLVA-базы данных. Определены основные задачи Референс-центра по разработке подходов к генотипированию возбудителя сибирской язвы, к числу которых относится изучение возможности использования дополнительных методов генотипирования, таких как анализ SNP, SNR с оценкой вариабельности описанных локусов и поиском новых полиморфных областей.

Ключевые слова: *B. anthracis*, сибирская язва, генотипирование, VNTR, MLVA, SNP, SNR.

A.G.Ryazanova, E.I.Eremenko, O.I.Tsygankova, E.A.Tsygankova, A.N.Kulichenko

Application of *Bacillus anthracis* Molecular Typing Methods by the Reference Center for the Anthrax Agent Monitoring

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol

Presented are the results of *B. anthracis* molecular typing of in the scope of work of the Reference center for the anthrax agent monitoring. Summarized is the experience of genotyping application in epidemiological investigation of anthrax outbreaks. MLVA-genotyping (8–25 VNTR-loci analysis) of *B. anthracis* strains, isolated in Russia and in neighboring regions is shown to provide the correct comparison of genotypes with the data of the global MLVA-data bank. The major tasks of reference center for the development of approaches to *B. anthracis* genotyping are identified. These approaches include research of additional genotyping methods such as SNP analysis, SNR analysis with assessment of the described loci variability and identification of new polymorphic regions.

Key words: *B. anthracis*, anthrax, genotyping, VNTR, MLVA, SNP, SNR.

Возбудитель сибирской язвы, *Bacillus anthracis*, до относительно недавнего времени считался генетически высокомономорфным. Индивидуальные различия геномов штаммов стали очевидными только после внедрения наиболее результативных методов молекулярного типирования, основанных на многолокусном анализе вариабельных областей генома *B. anthracis* (MLVA). Схема исследования восьми генетических областей с вариабельным числом tandemных повторов (VNTR-локусы), предложенная P.Keim *et al.* [9], широко применяется как самостоятельно, так и с использованием дополнительных VNTR-локусов [10, 11].

В настоящее время в мировой практике молекулярное типирование возбудителя сибирской язвы проводят, применяя метод MLVA в качестве самостоятельного, а также в сочетании с другими методами. В частности, MLVA дополняют анализом медленно эволюционирующих единичных нуклеотидных полиморфизмов (SNP) [13] и единичных нуклеотидных повторов (SNR), являющихся одной из разновидностей VNTR-локусов и обладающих очень высокой частотой мутаций [12].

В соответствии с приказом Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека № 88 от 17.03.2008 г. на базе

ФГУЗ СтавНИПЧИ Роспотребнадзора функционирует Референс-центр по мониторингу за возбудителем сибирской язвы. Одной из задач Референс-центра, для решения которой требуется использование методов генетического типирования, является создание геномных портретов штаммов *B. anthracis* с целью проведения оперативных и ретроспективных расследований вспышек сибирской язвы с использованием молекулярных методов анализа.

Материалы и методы

Обработку и обеззараживание исследуемого материала для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) выполняли согласно методическим указаниям [2]. Генотипирование штаммов проводили методом MLVA в собственной модификации с использованием олигонуклеотидных праймеров для 8–25 VNTR-локусов, описанных [9, 10, 11], а также разработанными в СтавНИПЧИ оригинальными методами, состоящими в сочетании использовании MLVA, анализа полиморфизма длины амплификационно-рестрикционных фрагментов гена протективного антигена (PCR-RFLP PA) и SNR [5]. Для некоторых локусов использовали секвенирование последовательностей ДНК.

Результаты и обсуждение

В оригинальном варианте MLVA выполняется с использованием флуоресцентно-меченых праймеров и анализа фрагментов амплификации в автоматическом анализаторе ДНК, что требует дорогостоящего оборудования и реактивов. Нами предложена более доступная модификация MLVA с использованием немеченых праймеров к VNTR-локусам, электрофоретического разделения фрагментов амплификации в агарозном геле, фрагментного анализа с помощью цифровой системы визуализации и компьютерной программы [4]. Результаты проведенного MLVA-8-генотипирования штаммов *B. anthracis*, выделенных за последние 55 лет на территории Российской Федерации и республик бывшего Советского Союза, позволили отнести штаммы как к описанным генотипам, так и выявить уникальные генотипы с их географической приуроченностью. Анализ восьми VNTR-локусов позволил определить характерный генотип, присущий штаммам с комплексом атипичных свойств, генотипические особенности штаммов *B. anthracis* с различным проявлением признаков, ассоциированных с патогенностью [1, 3, 4, 6].

Ретроспективное исследование 14 штаммов *B. anthracis*, выделенных из разных объектов в Ставропольском крае, Кабардино-Балкарской Республике и двух районах Республики Калмыкия в июле-августе 1998 г., выявило четыре разных MLVA-генотипа, идентичных в пределах каждой группы штаммов одной территории. Интерпретация этих результатов позволила сделать вывод о независимом характере вспышек сибирской язвы в четырех регионах. Напротив, MLVA-генотип штаммов, выделенных от людей и из почвы с места вынужденного убоя животных во время двух последовательных вспышек сибирской язвы, произошедших осенью 2006 г. и весной 2007 г. на сопредельных территориях – Моздокском районе Республики Северная Осетия-Алания и Курском районе Ставропольского края, оказался одинаковым. Эти данные свидетельствовали о происхождении штаммов из одного и того же стационарно неблагополучного пункта на территории Курского района Ставропольского края, что подтверждалось эпидемиологическим расследованием [7].

MLVA-генотипирование и секвенирование также были использованы при проведении оперативного эпидемиологического расследования с целью установления причинно-следственных связей формирования эпидемического неблагополучия по сибирской язве, сложившейся в 2010 г. в Омской области, а результаты исследования с их использованием имели ключевое значение.

После вынужденного убоя больных лошадей в Тюкалинском районе сибирской язвой заболело шесть человек, один из которых скончался. Эпидемиологическое расследование установило, что мясо вынужденно забитых лошадей из этого эпизоотического очага поступило на мясоперерабатываю-

щее предприятие Омска ООО «Дарина», где было использовано при изготовлении мясных полуфабрикатов, которые в дальнейшем поступили в торговую сеть нескольких областей Российской Федерации.

В Референс-центре проведена окончательная идентификация шести штаммов возбудителя сибирской язвы, выделенных из различных источников в ходе этой вспышки учреждениями Роспотребнадзора и Россельхознадзора. С целью отождествления штаммов проведено генетическое типирование методом MLVA с анализом 24 VNTR-областей генома *B. anthracis*. MLVA-24-генотипирование показало, что ДНК двух штаммов *B. anthracis*, выделенных ГУ «Омская областная ветеринарная лаборатория» из уха жеребца (д. Бекишево), уха кобылы (д. Бурановка), штамма, изолированного ФГУЗ СтавНИПЧИ, из пробы пельменей «Особенные», а также двух штаммов, выделенных из проб пельменей «Русские» (ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Тверской области»), имели идентичные MLVA-генотипы. ДНК штамма *B. anthracis*, выделенного из крови скончавшегося больного (ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Омской области»), имела MLVA-генотип, идентичный генотипу ДНК штаммов, выделенных из проб пельменей и материала от лошадей, по 22 хромосомным и 1 плазмидному локусу, отличаясь по размеру VNTR-фрагмента плазмиды капсулообразования rXO2 на 2 пары нуклеотидов (1 тандемный повтор). Такое изменение размера локуса, по всей видимости, обусловлено пассированием штамма возбудителя через организм человека, а также воздействием интенсивной антибактериальной терапии. Результаты проведенного генотипирования были подтверждены секвенированием и переданы в Управление Роспотребнадзора и следственные органы Омской области.

MLVA-генотипирование выявило принадлежность ДНК штаммов, изолированных в Омской области, к генотипу, не описанному в мировой базе данных генотипов *B. anthracis*, однако генотип этих штаммов был очень близок к генотипу штаммов, выделенных в Республике Бурятия в 2008 г., отличаясь по размеру неизвестного ранее аллеля одного хромосомного локуса – Seb-Vams 13 (247 п.н.), тогда как бурятские штаммы имели относительно распространенный в мире аллель (427 п.н.). Уникальность генотипов штаммов, выделенных в Омской области и Республике Бурятия, заключается в наличии редкого аллеля локуса *vrrB2* величиной 180 п.н., упоминавшегося в доступной литературе лишь однажды при описании MLVA-8-генотипа штамма, изолированного из трупа коровы в Эстонии [8].

При проведении лабораторного исследования материала от заболевших людей выделение культуры не всегда возможно, особенно, если отбор материала осуществлен после начала антибиотикотерапии. Так, во время вспышки сибирской язвы, произошедшей в Краснодарском крае в апреле 2011 г., Референс-центром проведено генотипирование ДНК возбудителя сибирской язвы, выделенных из натив-

ного материала – смывов с язв двух больных кожной формой сибирской язвы – без выделения культуры. ДНК-содержащего материала было достаточно для анализа ДНК по основной схеме генотипирования с исследованием 8 VNTR-локусов. Филогенетический анализ, проведенный для сравнения полученных данных с результатами MLVA-8-генотипирования ДНК штаммов, выделенных ранее на территориях Краснодарского края и сопредельных субъектов Южного и Северокавказского федеральных округов, установил, что исследованные ДНК имели размеры аллелей локусов и их сочетание, присущие большинству штаммов Юга России.

В СтавНИПЧИ также разработан методический подход к генетическому типированию возбудителя сибирской язвы, состоящий в сочетанном использовании MLVA, анализа PCR-RFLP PA и SNR. Включение в схему PCR-RFLP PA или SNR-локуса 16 A ch дает возможность разделить штаммы из одной вспышки, имеющие одинаковый MLVA-генотип, на группы. Использование сочетания MLVA с анализом трех SNR-локусов позволяет получить индивидуальную характеристику штаммов из одной вспышки [5].

Нами разработана база данных генотипов коллекционных штаммов сибирезвенового микроба «*Bacillus anthracis* genotypes». Она содержит сведения о происхождении и генотипах штаммов сибирезвенового микроба, выделенных в разных регионах РФ и некоторых бывших республиках СССР. База содержит информацию об аллелях от 8 до 25 VNTR-локусов, данные о SNR-локусах и генотипах гена протективно-антигена и позволяет пополнять ее данными об аллелях SNP-анализа и опубликованных генотипах. Для сравнения MLVA-25 генотипов штаммов, полученных в результате анализа, используют on line базу данных «*Bacillus anthracis* 2006» Web-сайта «MLVAbank for Bacterial Genotyping», охватывающую опубликованные генотипы штаммов *B. anthracis*.

Опираясь на имеющийся опыт молекулярного типирования возбудителя сибирской язвы сотрудники Референс-центра в 2010 г. разработали проекты методических рекомендаций «Использование метода MLVA для эпидемиологического расследования вспышек сибирской язвы» и «Генетическое типирование штаммов *Bacillus anthracis* методом MLVA-22».

Таким образом, современный подход к молекулярному типированию возбудителя сибирской язвы, признанный в настоящее время во всем мире, заключается в использовании MLVA-генотипирования с анализом от 8 до 25 VNTR-локусов как основополагающего метода, который может быть применен самостоятельно или в совокупности с другими методами типирования (например, анализ SNP, SNR и др.). Использование MLVA-генотипирования при анализе штаммов, выделенных в Российской Федерации и на сопредельных территориях, позволяет проводить корректное сравнение генотипов с данными всемирной MLVA-базы данных.

Задача Референс-центра по мониторингу за воз-

будителем сибирской язвы заключается в изучении возможности использования дополнительных методов генотипирования, таких как анализ SNP, SNR с оценкой вариабельности описанных локусов и поиском новых полиморфных областей, а также секвенировании последовательностей генов, полиморфных локусов генома *B. anthracis*. Перспективной является оценка информативности методов мультилокусного секвенирования (MLST), анализа длины амплифицированных фрагментов (AFLP) и целесообразности их применения как независимых методов типирования, так и в комплексе с существующими схемами. Результаты вышеизложенных исследований позволят в итоге стандартизировать методические подходы к генотипированию возбудителя сибирской язвы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Еременко Е.И., Рязанова А.Г., Цыганкова Е.А., Цыганкова О.И., Куличенко А.Н. Генотипические особенности штаммов *Bacillus anthracis* с разным проявлением признаков, ассоциированных с патогенностью. Пробл. особо опасных инф. 2010; 2(104):53–6.
2. Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности. Методические указания МУ 1.3.2569-09. М.; 2009.
3. Цыганкова О.И., Еременко Е.И., Брюханов А.Ф., Абгарян А.Г., Ефременко В.И., Рязанова А.Г. Генотипирование штаммов сибирезвенового микроба на территории стран СНГ. Журн. микробиол. эпидемиол. и иммунобиол. 2003; 6(приложение):51–6.
4. Шишкова Н.А., Мокриевич А.Н., Платонов М.Е., Светоч Т.Э., Маринин Л.И. Изучение генетического разнообразия штаммов сибирезвенового микроба из коллекции ГНЦ ПМБ. Пробл. особо опасных инф. 2010; 2(104):60–5.
5. Keim P., Price L.B., Klevytska A.M., Smith K.L., Schupp J.M., Okinaka R. et al. Multiple locus variable number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. J. Bacteriol. 2000; 182(10):2928–36.
6. Le Fleche P., Hauck Y., Onteniente L., Prieur A., Denoed F., Rasmise V. et al. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. BMC Microbiology. 2001; 1:2.
7. Lista F., Faggioni G., Valjevac S., Ciammaruconi A., Vaissaire J., Doujet C. et al. Genotyping of *Bacillus anthracis* strains based on automated capillary 25-loci multiple locus variable-number tandem repeats analysis. BMC Microbiol. 2006; 6:33.
8. Stratillo C.W., Lewis C.T., Bryden L., Mulvey M.R., Bader D. Single-nucleotide repeat analysis for subtyping *Bacillus anthracis* isolates. J. Clin. Microbiol. 2006; 44(3):777–82.
9. Van Ert M.N., Easterday W.R., Huynh L.Y. et al. Global Genetic Population Structure of *Bacillus anthracis*. PLoS ONE. 2007; 2(5):e461.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Eremenko E.I., Ryazanova A.G., Tsygankova E.A., Tsygankova O.I., Kulichenko A.N. [Genotypic peculiarities of *Bacillus anthracis* strains with different manifestation of pathogenicity-associated features]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2010; 104:53–6.
2. [Arrangement of work of laboratories using the nucleic acid amplification methods in the course of work with material containing microorganisms of pathogenicity groups I–IV. MU 1.3.2569-09]. М.; 2009.
3. Tsygankova O.I., Eremenko E.I., Bryukhanov A.F., Abgaryan A.G., Efremenko V.I., Ryazanova A.G. [Gene typing of *Bacillus anthracis* strains isolated on the territory of the CIS countries]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2003; 6(supplement):51–6.
4. Shishkova N.A., Mokrievich A.N., Platonov M.E., Svetoch T.E., Marinin L.I. [Study of the genetic diversity of the anthrax microbe strains from the collection of SRC AMB]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2010; 104:60–5.

Authors:

Ryazanova A.G., Eremenko E.I., Tsygankova O.I., Tsygankova E.A., Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. Sovetskaya St., 13–15, Stavropol, 355035, Russia. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Об авторах:

Рязанова А.Г., Еременко Е.И., Цыганкова О.И., Цыганкова Е.А., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: anthraxlab@mail.ru

Поступила 07.07.11.