

Н.А.Шишкова, Т.Б.Кравченко, Л.И.Маринин, А.Н.Мокриевич

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ПОЧВЫ СКОТОМОГИЛЬНИКА

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболensk

Использование современных генно-инженерных методов позволяет не только провести идентификацию сибиреязвенных штаммов, выделенных из почвы, но и осуществить сравнительные молекулярно-генетические исследования этих штаммов. Проведено лабораторное исследование 80 проб земли, взятых из старого скотомогильника, с использованием микробиологических и генетических методов. Эпидемиологическую значимость выделенных штаммов оценивали по результатам ПЦР с видоспецифическими праймерами и по данным многолокусного VNTR-анализа. Выделено шесть штаммов, три из которых отнесены к *B. anthracis*, а остальные – к близкородственным бациллам. Показана принципиальная возможность использования данной комплексной методики для типизации сибиреязвенных штаммов и их дифференциации от близкородственных микроорганизмов.

*Ключевые слова:* почва, скотомогильники, *B. anthracis*, VNTR-анализ.

N.A.Shishkova, T.B.Kravchenko, L.I.Marinin, A.N.Mokrievich

### Identification of *Bacillus anthracis* Isolated from Soil of the Animal Burial Site

State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk

The usage of modern gene engineering methods makes it possible not only to identify anthrax strains isolated from soil, but also to hold out comparative molecular genetic assays with these strains. Carried out was the laboratory research of 80 soil samples isolated from the old animal burial site using microbiological and genetic techniques. Epidemiological significance of the isolated strains was evaluated on the basis of the results of PCR with species-specific primers and multi-locus VNTR-analysis data. Extracted were the six strains, three of which were classified as *B. anthracis*, and the rest – as closely related bacillus. Demonstrated was the possibility to use this particular complex method for anthrax strains typing and their differentiation from closely related microorganisms.

*Key words:* soil, animal burial sites, *B. anthracis*, VNTR-analysis.

Основным резервуаром возбудителя сибирской язвы и основным фактором, поддерживающим непрерывность эпизоотического процесса в очагах, является почва, которую можно считать вторым, после инфицированных животных, источником этого заболевания, поскольку доказана возможность заражения животных и людей непосредственно от почвы. В Российской Федерации насчитывается около 35 тыс. стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов с почвенными очагами, в которых учтено 7940 сибиреязвенных скотомогильников. На протяжении последних пяти лет на территории РФ зарегистрировано 43 случая заболевания людей сибирской язвой, из них 3 – с летальным исходом. К сожалению, на многих территориях до настоящего времени не налажен должный учет скотомогильников и контроль за их санитарным состоянием. Поэтому остается актуальной проблема выявления и мониторинга возникших в прошлом захоронений животных, погибших от сибирской язвы.

Выделенные из почвы сибиреязвенные штаммы часто имеют атипичные признаки, что затрудняет их идентификацию. Проведение ПЦР с соответствующими видоспецифическими праймерами дает возможность не только идентифицировать выделенные из почвы сибиреязвенные штаммы и оценить их эпидемиологическую опасность, но и провести сравнительные молекулярно-генетические исследования. Использование метода мультилокусного определения

вариабельного числа tandemных повторов (VNTR) позволяет обнаружить значительное внутривидовое разнообразие возбудителя сибирской язвы, считавшегося ранее мономорфным.

Целью работы являлась оценка возможности использования, наряду с классическими микробиологическими методами, современных генетических подходов с применением ПЦР с видоспецифическими праймерами [8] и многолокусного VNTR-анализа [7] для типизации и дифференциации штаммов, выделенных из почвы старого скотомогильника.

### Материалы и методы

Работа проведена на 18 штаммах из Коллекции микроорганизмов ФГУН ГНЦ ПМБ: *B. anthracis* 71/12 (2-я вакцина Ценковского); СТИ-1; СТИ-RIF4; 1 Коломна; 81/1; 10; 32 (603); 193 Куба II; Dakar; *B. subtilis* 168; *B. subtilis* var. niger; *B. thuringiensis* 1373; *B. megaterium* 1433; *B. brevis* 1409; *B. cereus* 217 (*anthracoides*); *B. cereus* 164; *B. cereus* 504; *B. polymixa*.

Исследованы пробы почвы, взятые из старого скотомогильника (захоронению более 70 лет), находящегося в Тверской области. Исследуемый участок разделили на квадраты и отобрали в целом 80 проб земли. Диагностические исследования проб почвы проводились в соответствии с методическими указаниями по лабораторной диагностике и обнару-

жению возбудителя сибирской язвы [1]. Выделение штаммов проводили на высокочувствительной плотной питательной среде по Лурия-Бертани (LA) [3] с полимиксином В. Из почвы было выделено шесть изолятов, которые получили обозначения П-1, П-4о, П-4, П-4ш, П-4с и П-14. Штаммы культивировали при температуре 37 °С в жидкой и на плотной питательных средах.

Пробоподготовку и выделение ДНК проводили в соответствии с методическими указаниями «Обеззараживание исследуемого материала, инфицированного бактериями I–IV групп при работе методом ПЦР» [2]. Праймеры для определения величин *vrr*-фрагментов синтезированы на фирме Amersham. Прямые праймеры были мечены  $Sy^{TM5}$  амидитом (Pharmacia, США). Видоспецифические праймеры для *B. anthracis* были синтезированы фирмой «Литех» (Москва). ПЦР проводили с использованием набора Ready-to-go-Beads (Amersham Pharmacia Biotech, США) на термоциклере Терцик (Москва). Для определения размеров ПЦР-ампликонов с видоспецифическими праймерами использовали стандартный способ оценки по показателю электрофоретической подвижности в геле агарозы (1,2 %) с последующим окрашиванием бромистым этидием или в полиакриламидном геле (6 %) с последующим окрашиванием серебром в сравнении с маркером молекулярных масс 100 бр. Определение нуклеотидных последовательностей и размеров фрагментов осуществляли на автоматическом секвенаторе ALFexpressII (Amersham Pharmacia Biotech, США) с использованием меченых  $Sy^{TM5}$  амидитом праймеров.

При выполнении данных работ соблюдали требования безопасной работы, изложенные в Санитарно-эпидемиологических правилах «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)» СП 1.3.1285-03.

### Результаты и обсуждение

На первом этапе исследований была проведена оценка культурально-морфологических свойств выделенных из почвы штаммов. По характеру роста в L-бульоне выделенные 6 штаммов бацилл можно было подразделить на три типа культур. Кроме того, были оценены способность штаммов к лизису специфическими сибиреязвенными бактериофагами

Гамма и КВИЭВ, чувствительность к ампициллину и гемолитическая активность [3]. Полученные характеристики выделенных штаммов представлены в табл. 1, из данных которой видно, что к типичным штаммам *B. anthracis* можно отнести только два из шести изолятов – штаммы П-1 и П-4о. Отсутствие капсулы при культивировании этих штаммов на бикарбонатно-сывороточном агаре, вероятно, связано с их частичной аттенуацией в процессе длительного нахождения в почве.

Далее было проведено выделение ДНК из исследуемых и контрольных штаммов и тестирование в ПЦР с набором праймеров *pag*, *lef*, *cy*, *cap*, *Ba 813*, комплементарных к выявленным локусам генома сибиреязвенного микроба по методу [6]. Для сравнения исследовали штаммы *B. anthracis* с различными гено- и фенотипами (81/1; 71/12; СТИ-1; СТИ-RIF4; 1; 10; 32; 193; Dakar) и 9 штаммов близкородственных бацилл. Результаты представлены в табл. 2.

Как следует из приведенных в табл. 2 результатов, только два из шести выделенных штаммов являются «полноценными» *B. anthracis* в генетическом отношении – это штаммы П-1 и П-4о (в ПЦР выявлены все пять видоспецифических ПЦР-фрагментов *pag*, *lef*, *cy*, *cap*, *Ba 813*), что согласуется с характеристиками выделенных штаммов, приведенными выше. Штамм П-4 можно отнести к атипичному бескапсульному варианту *B. anthracis*, сходному с атипичными штаммами *B. anthracis* 10, 32, 193 и Dakar, также дефектными по гену отечного фактора. Штаммы П-4с, П-4ш и П-14 несли только один хромосомный маркер *Ba 813*, который обнаруживается и у *B. cereus*, следовательно, их можно отнести к близкородственным штаммам.

Дополнительно с помощью иммуноблоттинга с кроличьими моноспецифическими сыворотками, полученными нами ранее к отдельным компонентам сибиреязвенного токсина, изучены спектры секретируемых почвенными штаммами белков (данные не приведены). Показано, что все три компонента токсина синтезируются только штаммами П-1 и П-4о, что подтверждает данные ПЦР.

Для генотипирования выделенных почвенных штаммов нами был использован метод многолокусного VNTR-типирования с использованием шести хромосомных *vrrA*, *vrrB1*, *vrrB2*, *vrrC1*, *vrrC2* и *cg3* и двух плазмидных маркеров *pXO1* и *pXO2*

Таблица 1

Свойства штаммов бацилл, выделенных из почвы скотомогильника

Штамм	Свойства штаммов					
	Проба с фагами Гамма и КВИЭВ	Зона ингибирования на среде с ампициллином, мм	Гемолиз на кровяном агаре	Проба с гамма-глобулином	Морфология колоний на бикарбонатно-сывороточной среде	Рост в L-бульоне
П-1	+	22	-	+	Шероховатые	Типичный рост
П-4о	+	10	-	+	Шероховатые	Типичный рост
П-4	+	3	+	±	Шероховатые	Осадок, бульон мутный
П-4ш	-	0	+	-	Шероховатые	Осадок, бульон мутный
П-4с	-	0	+	-	Шероховатые	Осадок, бульон мутный
П-14	-	0	+	-	Шероховатые	Осадок, бульон прозрачный

Таблица 2

Результаты постановки ПЦР с ДНК некоторых штаммов бацилл

Штамм	Праймер				
	Ba 813 152 п.н.	cap 264 п.н.	lef 385 п.н.	суа 546 п.н.	pag 747 п.н.
П-1	+	+	+	+	+
П-4о	+	+	+	+	+
П-4	+	-	+	-	+
П-4ш	+	-	-	-	-
П-4с	+	-	-	-	-
П-14	+	-	-	-	-
<i>B. anthracis</i> 81/1	+	+	+	+	+
<i>B. anthracis</i> 71/12	+	+	+	+	+
<i>B. anthracis</i> СТИ-1	+	-	+	+	+
<i>B. anthracis</i> СТИ Rif4	+	-	-	-	-
<i>B. anthracis</i> 10 – атипичный	+	-	+	-	+
<i>B. anthracis</i> 32 – атипичный	+	-	+	-	+
<i>B. anthracis</i> 193 – атипичный	+	-	+	-	+
<i>B. anthracis</i> Dakar	+	-	+	-	+
<i>B. cereus</i> 504	+	-	-	-	-
<i>B. cereus</i> 217 (anthracoides)	+	-	-	-	-
<i>B. cereus</i> 164	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i> 168	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i> var. niger	-	-	-	-	-
<i>B. thuringiensis</i>	-	-	-	-	-
<i>B. brevis</i>	-	-	-	-	-
<i>B. polymixa</i>	-	-	-	-	-
<i>B. megaterium</i>	-	-	-	-	-

[7]. Результаты определения величин варьируемых фрагментов по этим локусам приведены в табл. 3.

Из представленных данных видно, что выделенные из почвы штаммы П-1 и П-4о с типичными культурально-морфологическими признаками, чувствительные к ампициллину и сибиреязвенному

бактериофагу и являющиеся типичными штаммами *B. anthracis* по результатам ПЦР с видоспецифическими праймерами, укладываются также в схему VNTR-типирования, разработанную для *B. anthracis*. Полученные значения величин фрагментов по 8 локусам позволяют отнести штаммы П-1 и П-4о к подгруппе *B. anthracis* АЗ. Следовательно, из почвы старого скотомогильника нами выделены два типичных эпидемически значимых штамма *B. anthracis*, несущих генетические элементы, кодирующие синтез компонентов токсина и капсулы.

Штамм П-4, отличающийся по ряду признаков от типового, а именно, по характеру роста в жидкой питательной среде, гемолизу эритроцитов и слабой чувствительности к ампициллину, имеет шесть из восьми совпадающих с известными величинами VNTR-локусов, в частности, *vrrA*, *vrrB1*, *vrrB2*, *vrrC2*, *cg3*, *pXO1*. Поскольку не амплифицировались фрагменты, соответствующие локусу *VrrC1* и капсуле, то отнести штамм П-4 к какой-либо VNTR-подгруппе оказалось невозможным. Следовательно, нами выделен ранее не охарактеризованный атипичный штамм *B. anthracis*, не представляющий эпидемической опасности, но требующий дальнейшего детального изучения.

Для остальных штаммов (П-4ш, П-4с и П-14) по величинам *vrr*-локусов получена картина, сходная с таковой для штамма *B. cereus* 504. Для уточнения полученных данных нами специально был отсеквенирован *pXO1*-фрагмент штамма *B. cereus* 504. Ниже приведены результаты (шрифтом выделены прямой и обратный праймеры, а повторяющиеся последовательности – курсивом).

*B. cereus* 504 – *pXO1* – 129  
 СААГТТАТТААСГАТСАГАТТААГТТСА  
 ТТАТТААСТСАТААГТААТГТАТТАААААТ  
 ТТТСАААТГГАТТ  
*ААТ ААТ ААТ ААТ ААТ ААТ ААТ*  
 ААСГГГАССАГССАТТАТГААГСААСТААТТ  
 СТАГА

Таблица 3

Величины фрагментов *vrr*-областей штаммов, выделенных из сибиреязвенного скотомогильника

Штамм	<i>vrrA</i>	<i>vrrB1</i>	<i>vrrB2</i>	<i>vrrC1</i>	<i>vrrC2</i>	<i>cg3</i>	<i>pXO1</i>	<i>pXO2</i>
<i>B. anthracis</i> 81/1	313	230	161	609	600	152	135	136
<i>B. anthracis</i> 1	324	230	162	617	601	153	136	137
<i>B. anthracis</i> 71/12	315	230	161	611	527	153	135	136
<i>B. anthracis</i> СТИ-1	316	229	162	613	602	153	133	136
<i>B. anthracis</i> 10 *	315	230	160	613	599	156	136	136
<i>B. anthracis</i> Dakar	298	229	161	496	472	156	134	144
<i>B. anthracis</i> 32 *	312	230	161	-	528	155	133	136
<i>B. anthracis</i> 193 *	310	229	163	673	585	-	-	136
П-1	313	228	164	613	532	153	133	135
П-4о	315	228	161	611	533	153	130	136
П-4	313	229	161	-	533	154	133	-
П-4ш	278	264	-	-	336	-	-	-
П-4с	285	264	163	-	312	-	-	-
П-14	294	265	164	-	324	-	-	-
<i>B. cereus</i> 504	282	266	164	-	308	-	130	-

\*Атипичные штаммы.

Результаты сиквенса фрагмента ДНК *B. cereus* полностью укладываются в классификацию, предложенную P.Keim и соавт. для *B. anthracis* [7]. Это может быть связано с очень высокой степенью гомологии генома, что отражает недавнюю эволюцию *B. anthracis* от родительской субгруппы *B. cereus* [6]. Показано, что некоторые изоляты *B. cereus* содержат последовательности, сходные более чем с половиной последовательностей открытых рамок считывания плазмиды pXO1 *B. anthracis*, причем основная часть ДНК-фрагментов *B. cereus* имела сходство от 80 до 98 %.

Совпадение данных по локусам vtgB2 и pXO1 *B. anthracis* и *B. cereus* значительно затруднило однозначную дифференциацию этих видов, тем не менее, поскольку по всем остальным локусам имелись значительные отличия от *B. anthracis*, штаммы П-4ш, П-4с и П-14 с большой степенью вероятности можно отнести к *B. cereus*.

Это – еще одно свидетельство сложности процесса дифференциации бациллярных штаммов. С целью повышения эффективности типирования бацилл в настоящее время предлагаются различные комбинации методов в зависимости от поставленных задач, но, вследствие высокой генетической мономорфности сибиреязвенного микроба, мультилокусный VNTR-анализ может оказаться наиболее приемлемым для типирования *B. anthracis* [4, 5].

Оценивая полученные данные по идентификации выделенных из старого скотомогильника бацилл, можно сделать вывод о том, что для точного подтверждения выделения возбудителя сибирской язвы по-прежнему необходимо проведение комплексных исследований – микробиологических, иммунобиологических и молекулярно-генетических. Микробиологический анализ показал присутствие в почве скотомогильника двух культур *B. anthracis*, обладающих всеми типичными для возбудителя сибирской язвы характеристиками. Эти данные были подтверждены результатами ПЦР с пятью праймерами к *pag*, *lef*, *суа*, *cap*, *Va 813*, разработанными для генома сибиреязвенного микроба.

Дополнительные исследования выделенных штаммов с использованием мультилокусного VNTR-анализа позволили отнести выделенные штаммы П-1 и П-4о к подгруппе *B. anthracis* A3, выявить ранее не охарактеризованный атипичный штамм *B. anthracis* П-4, и предварительно отнести выделенные штаммы П-4ш, П-4с и П-14 с нетипичными для сибиреязвенного микроба свойствами к *B. cereus*.

Таким образом, нами показана принципиальная возможность использования комплексной методики

для типизации сибиреязвенных штаммов и их дифференциации от близкородственных микроорганизмов.

Работа выполнена по государственным контрактам Ф/2/09 от 09.07.2009 г. и 119-Д от 11.06.2009 г. в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности (2009–2013 гг.)».

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы. Методические указания. МУК 4.2.2413-08. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2009. 67 с.
2. Обеззараживание исследуемого материала, инфицированного бактериями I–IV групп при работе методом ПЦР. Методические указания. МУ 3.5.5.-1034-01. М: МЗ РФ; 2001. 8 с.
3. Маринин Л.И., Дятлов И.А., Мокриевич А.Н., Бахтеева И.В., Белова Е.В., Борзилов А.И. и др. Методы изучения биологических свойств возбудителя сибирской язвы. М.: ЗАО МП «Гигиена»; 2009. 304 с.
4. Кутырев В.В., Смирнова Н.И. Генодиагностика и молекулярное типирование возбудителей чумы, холеры и сибирской язвы. Мол. генет., микробиол., вирусол. 2003; 1:6–14.
5. Цыганкова О.И., Еременко Е.И., Цыганкова Е.А. и др. Фенотипические и генетические особенности культурально-морфологических вариантов *Bacillus anthracis* Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2008; 4:6–11.
6. Helgaso E., Okstad O.A., Caugant D.A., Johansen H.A., Fouet A., Mock M. et al. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*: one species on the basis of genetic evidence. Appl. Environ. Microbiol. 2000; 66:2627–30.
7. Keim P., Price L.B., Klevytska A.M., Smith K.L., Schupp J.M., Okinaka R. et al. Multiple-locus VNTR analysis (MLVA) reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. J. Bacteriol. 2000; 182:2928–36.
8. Patra G., Sylverste P., Ramisse V. et al. Specific oligonucleotide primers for rapid identification of *Bacillus anthracis* strains. Proc. Inter. Workshop on Anthrax. Winchester, England, September 19–21, 1996. P. 45–6.

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

1. [Laboratory diagnostics and detection of *Bacillus anthracis*. Methodological instructive regulations. MIR 4.2.2413-08]. M.: State Rosпотребнадzor Center of Hygiene and Epidemiology; 2009. 67 p.
2. [Decontamination of the test material, infected by the bacteria of the I–IV groups, while using PCR-based methods. Methodological instructive regulations. MIR 3.5.5.-1034-01]. M.: Ministry of Health of the Russian Federation; 2001. 8 p.
3. Marinin L.I., Dyatlov I.A., Mokrievich A.N., Bakhteeva I.V., Belova E.V., Borzilov A.I. et al. [Methods for examination of *Bacillus anthracis* biological properties]. M.: ZAO MP "Gigiena"; 2009. 304 p.
4. Kutyrev V.V., Smirnova N.I. [Gene diagnostics and molecular typing of etiological agents of plague, cholera, and anthrax]. Mol. Gen. Microbiol. Virusol. 2003; 1:6–14.
5. Tsygankova O.I., Eremenko E.I., Tsygankova E.A. et al. [Phenotypic and genetic peculiarities of the cultural and morphologic *Bacillus anthracis* variants]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 2008; 4:6–11.

#### Authors:

Shishkova N.A., Kravchenko T.B., Marinin L.I., Mokrievich A.N. State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russia. E-mail: info@obolensk.org

#### Об авторах:

Шишкова Н.А., Кравченко Т.Б., Маринин Л. И., Мокриевич А.Н. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. 142279, Московская обл., п. Оболensk, E-mail: info@obolensk.org

Поступила 22.04.11.