СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ БИОЛОГИЯ, 2018, том 53, № 2, с. 404-413

Микробиология и ветеринария

УДК 619:579.62:616.9 doi: 10.15389/agrobiology.2018.2.404rus

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ, БИОХИМИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ШТАММОВ *Bacillus anthracis*, ВЫДЕЛЕННЫХ ВО ВРЕМЯ ВСПЫШЕК СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (2014-2016 годы)*

Ю.О. СЕЛЯНИНОВ[1], И.Ю. ЕГОРОВА[1], Я.И. АЛЕКСЕЕВ[2], А.В. КАЗАНЦЕВ[2], Ю.А. МОНАХОВА[2], Д.В. КОЛБАСОВ[1]

Несмотря на то, что в Российской Федерации разработаны и достаточно широко внедрены эффективные меры по предупреждению возникновения и распространения сибирской язвы, в 2014-2016 годах было зарегистрировано семь ее очагов в Волгоградской, Ростовской, Белгородской, Саратовской областях, в Республике Татарстан и шесть вспышек в популяции северных оленей на территории двух районов Ямало-Ненецкого автономного округа (в последних пало 2657 оленей). В статье нами впервые описаны молекулярно-генетические, биологические свойства и филогенетические взаимоотношения изолятов возбудителя сибирской язвы, выделенных во время вспышек болезни в Волгоградской области, Ямало-Ненецком автономном округе и из почв захоронений в Республике Чувашия в последние три года. При проведении исследований использовали как общепринятые подходы, так и авторские методики. Изучали фенотипические свойства и диагностические признаки бактерий (морфология роста в бактериологических питательных средах, подвижность, окрашивание по Граму, капсулообразование in vivo и in vitro, спорообразование, протеолитическая, гемолитическая, лецитиназная, фосфатазная, гликолитическая активности, способность синтезировать протокатехоевую кислоту, сорбировать конго красный из среды, фагочувствительность, токсинообразование in vitro, плазмидный профиль, чувствительность к антибиотикам, рекомендованным для применения в ветеринарии, вирулентность для лабораторных животных). MLVA-типирование штаммов сибиреязвенного микроба проводили по 20 VNTR-локусам. Показано, что по основным фенотипическим и диагностическим признакам штаммы возбудителя сибирской язвы различались незначительно и в целом соответствовали типовому штамму *Bacillus anthracis*. Наиболее выраженные различия в фенотипических свойствах выявлены у аспорогенного и авирулентного штамма № 6017 *B. anthracis*, выделенного в 2016 году от лопарской оленегонной собаки. Штаммы, выделенные в течение одной вспышки, группировались в отдельные кластеры, а внутри кластера некоторые из них незначительно различались (по 1-2 локусам). Изоляты из почв захоронений в Республике Чувашия и выделенные от лопарской оленегонной собаки во время вспышки болезни в Ямало-Ненецком автономном округе, сформировали отдельные кластеры. При паспортизации изученных штаммов *B. anthracis* установлена их высокая эпизоотическая опасность, обусловленная факторами патогенности, экспрессирующимися in vitro. Показано наличие капсуло- и токсинообразования, высокий уровень синтеза гемолизинов, протеаз, продукция протокатехоевой кислоты, а также вирулентность для лабораторных мышей в дозах 6-1000 спор. Полученные результаты подтверждают необходимость постоянного мониторинга и оценки эпизоотической опасности сибиреязвенных захоронений и падежных мест (моровых полей), а также проведения эффективных профилактических мероприятий против сибирской язвы.

Ключевые слова: сибирская язва, штаммы *Bacillus anthracis*, фенотипические свойства, генетические свойства, вирулентность, MLVA.

Несмотря на то, что в Российской Федерации разработаны и достаточно широко внедрены эффективные меры по предупреждению возникновения и распространения сибирской язвы, ежегодно (за исключением 2016 года) в стране регистрируют единичные случаи этой инфекции среди животных (1-4). Так, по данным информационно-аналитического центра Россельхознадзора (http://www.fsvps.ru/fsvps/iac/messages), в 2014-2016 годах зафиксировано семь очагов сибирской язвы в Волгоградской, Ростовской, Белгородской, Саратовской областях, Республике Татарстан и шесть вспышек — в популяции северных оленей на территории двух районов Ямало-Ненецкого автономного округа (в последних заболело и пало 2657 оленей).

* Исследование выполнено с использованием научного оборудования Центра коллективного пользования «Биотехнология» ВНИИСБ и поддержано программой развития биоресурсных коллекций ФАНО.

Выделение новых штаммов в процессе мониторинга за инфекционными болезнями животных и человека и изучение фенотипических, биохимических и молекулярно-генетических свойств изолятов позволяет выявить клональное распространение возбудителя и определить его происхождение (5-8). Кроме того, на основе биологических характеристик определяют иммунологическое соответствие штаммов бактерий, циркулирующих среди животных, со штаммами, входящими в состав вакцинных препаратов, исследуются основные диагностические признаки бактериальных патогенов, формирование у них лекарственной устойчивости и устойчивости к биоцидам из различных химических классов (9-12). В свою очередь, эти данные используют при эпидемической и эпизоотической паспортизации штаммов (оценке степени эпидемической/эпизоотической опасности) и разработке корректирующих действий для повышения эффективности специфических и неспецифических мероприятий для профилактики и ликвидации инфекционных болезней животных и человека (13, 14).

В настоящем сообщении нами описаны свойства и филогенетические взаимоотношения изолятов возбудителя сибирской язвы, выделенных из почвы с мест захоронения и от павших животных во время вспышек болезни на территории России в 2014-2016 годах, в том числе при крупнейшей за последние несколько десятилетий эпизоотии в популяции северного оленя.

Цель работы — комплексное изучение характеристик и паспортизация штаммов возбудителя сибирской язвы, выявленных на территории Российской Федерации.

Методика. Штаммы (11 культур *Bacillus anthracis*) были выделены в 2014-2016 годах от крупного рогатого скота, лопарской оленегонной собаки, северных оленей и из почв захоронений во время вспышек сибирской язвы в Волгоградской области и Ямало-Ненецком автономном округе, а также из почв захоронений в Республике Чувашия. Все штаммы депонированы в Государственной коллекции микроорганизмов, вызывающих опасные, особо опасные, в том числе зооантропонозные и не встречающиеся на территории страны болезни животных (ГКМ-ФИЦВиМ).

Диагностические признаки возбудителя сибирской язвы изучали согласно методическим указаниям МУК 4.2.2413-08 (М., 2009), фенотипические свойства, ассоциируемые с патогенностью возбудителя (протеолитическая, гемолитическая, лецитиназная, фосфатазная, гликолитическая активности, способность синтезировать протокатехоевую кислоту, сорбировать конго красный из среды), — в соответствии с рекомендациями (15).

Использовали ростовые и дифференциально-диагностические питательные среды: среду для выделения и культивирования сибиреязвенного микроба (ФГУН «ГНЦ ПМБ», Россия); агар питательный полужидкий (ООО «БиоКомпас», Россия); среду для определения капсуло- и токсинообразования на основе агара Хоттингера (патент РФ № 2204607); казеиновый агар (16); среду на основе 10 % эмульсии куриного желтка в физиологическом растворе; L-агар с конго красным (25 мкг/мл); двухслойный кровяной агар (патент РФ № 2238316); агар Мюллера-Хинтона («HiMedia Laboratories Pvt. Ltd», Индия). Споры сибиреязвенных культур получали на картофельном агаре согласно методическим указаниям МУ 3.5.2435-09 (М., 2009) и хранили в 30 % глицерине.

Чувствительность штаммов *B. anthracis* к антибактериальным препаратам оценивали в соответствии с МУК 4.2.1890-04 (М., 2004) на агаре Мюллера-Хинтона, используя набор дисков для ветеринарных лабораторий (ООО «НИЦФ», г. Санкт-Петербург).

О капсуло- и токсинобразовании штаммов *B. anthracis* in vitro судили по наличию слизистых колоний и линии преципитации на среде для определения капсуло- и токсинообразования при содержании в воздушной среде 10 % CO_2. Для обнаружения капсулы in vivo 1-суточной бульонной культурой каждого штамма заражали по 2 мыши массой 18-20 г (0,5 см^3 внутрибрюшинно). Если мыши не погибали в течение 10 сут, их подвергали эвтаназии CO_2. Для подтверждения капсулообразующей способности штаммов из выросших слизистых колоний и из органов павших мышей готовили мазки-отпечатки, фиксировали смесью спирта с эфиром (1:1) в течении 30 мин и окрашивали метиленовым синим по Леффлеру или по Романовскому-Гимзе согласно инструкции по применению красителей. Мазки микроскопировали при увеличении ×900, обнаружение вокруг клеток капсулы розового цвета свидетельствовало о продукции штаммом капсульного полипептида. Биохимические свойства выделенных культур оценивали с использованием тест-системы для биохимической идентификации бацилл и родственных видов Microgen® Bacillus-ID (MID-66) («Microgen Bioproducts», Великобритания).

Вирулентность исследуемых штаммов (показатели LD_{100} и LD_{50}) определяли на клинически здоровых белых аутбредных мышах массой 18-20 г обоих полов (кормление и содержание животных — согласно принятым нормам). Работу с животными осуществляли в соответствии с European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986). Из животных по принципу аналогов формировали 5 групп мышей (по 6 гол.) для каждого изолята, которым подкожно вводили по 0,5 см^3 соответствующей споровой суспензии (2×10^8, 4×10^7, 8×10^6, $1,6\times10^6$, $3,2\times10^5$ спор/см^3). Наблюдение за мышами и учет их гибели проводили в течение 10 сут. Величину LD_{50} рассчитывали по формуле Кербера в модификации И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева (17). За LD_{100} принимали минимальное количество спор, вызывающее гибель 100 % мышей в опыте.

Для выделения суммарной (хромосомной и плазмидной) ДНК применяли набор ДНК-сорб-С-М вариант 50 (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, г. Москва).

При постановке PCR использовали тест-систему АмплиСенс® Bacillus anthracis-FRT (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, г. Москва) для выявления генетических детерминант основных факторов патогенности — капсултного полипептида и токсина. MLVA типирование (multilocus variable number tandem repeat analysis) осуществляли по 20 VNTR (variable number tandem repeat) локусам хромосомной и плазмидной локализации с PCR-праймерами, описанными F. Lista с соавт. (18), которые входят в набор реагентов для генетического типирования штаммов возбудителя сибирской язвы методом фрагментного анализа (ОМ-Сибирская язва-Генотип) по ТУ 9398-018-46395995-2013 (ООО «Синтол», г. Москва). PCR и MLVA выполняли в соответствии с инструкциями по применению тест-систем на амплификаторе C1000 Touch Thermal Cycler с модулем для PCRq CFX96 Real-Time System («Bio-Rad», США). При постановке MLVA (18) секвенирование каждого из локусов проводили в 8-капиллярном автоматическом генетическом анализаторе НАНОФОР 05 (Экспериментальный завод научного приборостроения РАН, г. Черноголовка).

При построении дендрограммы на основании данных MLVA-типирования использовали метод UPGMA.

Результаты. Характеристика изученных штаммов по объекту и тер-

ритории, на которой они были выделены, представлена в таблице 1.

1. Штаммы возбудителя сибирской язвы *Bacillus anthracis*, выделенные на территории России в 2014-2016 годах

Штамм	Инвентарный №	Откуда выделен
		Волгоградская область
		(выделены в Волгоградской областной ветеринарной лаборатории, 2014 год)
6246	370	Селезенка крупного рогатого скота
3158/317-318	371	Почва
3184/410	372	Биоматериал (Дубцовский р-н)
		Республика Чувашия
		(выделен в Чувашской республиканской ветлаборатория, 2016 год)
5833	373	Почва с мест захоронения
		Ямало-Ненецкий автономный округ
		(выделены во Всероссийском НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии РАСХН, 2016 год)
5875	374	Ухо северного оленя
5885	375	Ухо северного оленя
5886	376	Ухо северного оленя
6017	377	Истечения из носа лопарской оленегонной собаки
6019	378	Ухо северного оленя
6063	379	Ухо северного оленя
6064	380	Ухо северного оленя

2. Проявление фенотипических, серологических и биологических свойств, ассоциируемых с патогенностью, у штаммов возбудителя сибирской язвы *Bacillus anthracis*, выделенных на территории России в 2014-2016 годах

Штамм	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
6246	T	R	–	+	+	+	+	+	+	–	+++	+	+++	α	+	±	+
3158/317-318	T	R	–	+	+	+	+	+	+	–	+++	+	+++	α	+	±	+
3184/410	T	R	–	+	+	+	+	+	+	–	+++	+	+++	α	+	±	+
5875	T	R	–	+	+	+	+	+	+	–	+++	–	+++	α	+	+	+
5885	T	R	–	+	+	+	–	+	+	–	+++	–	+++	α	+	+	+
5886	T	R	–	+	+	+	–	+	+	–	+++	–	+++	α	+	+	+
6019	T	R	–	+	+	+	+	+	+	–	+++	–	+++	α	+	+	+
6063	T	R	–	+	+	+	–	+	+	–	+++	–	+++	α	+	+	+
6064	T	R	–	+	+	+	–	+	+	–	+++	–	+++	α	+	+	+
6017	T	R	–	–	+	–	–	–	–	–	+++	+	+++	α	+	+	+
5833	T	R	–	+	+	+	+	+	+	–	+++	+	+++	α	+	+	+

Примечание. 1 — морфология клеток, 2 — морфология колоний, 3 — фосфатазная активность, 4 — спорообразование, 5 — наличие плазмиды pXO1, 6 — наличие плазмиды pxo2, 7 — токсинообразование in vitro, 8 — капсулообразование in vitro, 9 — капсулообразование in vivo, 10 — лецитиназная активность, 11 — уровень экспрессии протеаз, 12 — синтез протокатахоевой кислоты, 13 — уровень экспрессии гемолизинов, 14 — тип гемолиза,15 — сорбция конго красного из среды, 16 — лизис фагом Fah-ВНИИВВиМ, 17 — лизис фагом RD-ph-6. T — типичная морфология, R — колонии R-типа (шероховатые); «+/–» — проявление признака оценено положительно/отрицательно, «±» — слабая чувствительность к фагу.

3. Биохимическая активность у штаммов возбудителя сибирской язвы *Bacillus anthracis*, выделенных на территории России в 2014-2016 годах

Штамм	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
6246	–	–	–	+	–	–	–	–	+	–	–	+	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	+
3158/317-318	–	+	–	+	–	–	–	–	+	–	–	+	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	+
3184/410	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	+
5875	–	–	–	-	–	–	–	–	+	–	–	+	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	+
5885	–	–	–	+	–	–	–	–	+	–	–	+	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	+
5886	–	–	–	+	–	–	–	–	+	–	–	+	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	+	+
6019	–	–	–	+	–	–	–	–	+	–	–	+	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	+
6063	–	–	–	+	–	–	–	–	+	–	–	+	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	+
6064	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	+
6017	–	–	–	+	–	–	–	–	+	–	–	+	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	+
5833	–	–	–	+	–	–	–	–	+	–	–	+	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	+

Примечание. 1, 2, 3, 4, 5, 6 — соответственно ферментация арабинозы, маннитола, рамнозы, сахарозы, адонитола, метил-D-глюкозида; 7 — продукция индола, 8 — утилизация цитрата; 9, 10, 11, 12, 13, 14 — ферментация целлобиозы, маннозы, салицина, трегалозы, галактозы, инулина; 15 — продукция ONPG (ortho-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside), 16 — тест Фогеса-Проскауэра, 17, 18, 19, 20, 21, 22 — ферментация инозитола, раффинозы, сорбитола, ксилозы, метил-D-маннозида, мелицитозы; 23 — разложение аргинина, 24 — восстановление нитратов до нитритов; «+/–» — проявление признака оценено положительно/отрицательно.

При изучении основных идентификационных признаков штаммов

B. anthracis установлено, что рабочая коллекция представлена 10 типичными вирулентными культурами и одним штаммом, атипичным по капсуло- и спорообразованию. Результаты комплексной оценки свойств штаммов показали, что они по фенотипическим признакам (морфология роста в жидких и на твердых питательных средах, подвижность, окрашивание по Граму, капсулообразование in vivo и in vitro, спорообразование), биохимической активности (протеолитическая, гемолитическая, лецитиназная, фосфатазная, гликолитическая активности, способность синтезировать протокатехоевую кислоту, сорбировать конго красный из среды), антигенным свойствам (реакция термопреципитации по Асколи), чувствительность к сибиреязвенным бактериофагам Fah-ВНИИВВиМ и RD-ph-6, токсинообразование in vitro, плазмидный профиль (наличие фрагментов генов капсуло- и токсинообразования в PCR), чувствительности к антибиотикам, рекомендованным для применения в ветеринарии, имели незначительные различия (табл. 2, 3). За исключением штамма № 6017, выделенного от лопарской оленегонной собаки, все культуры показали высокую экспрессию гемолизинов и протеаз, образовывали капсульный полипептид in vitro (колонии слизистой консистенции S-, M или SM-формы на среде для определения капсуло- и токсинообразования) и in vivo (капсульные палочки в мазках-отпечатках с органов павших мышей), вызывали гемолиз эритроцитов по α-типу, сорбировали конго красный из среды. Отличительной особенностью штаммов *B. anthracis*, выделенных в Ямало-Ненецком автономном округе было отсутствие или слабая продукция протокатехоевой кислоты. По продукции токсина in vitro (визуально определяемый) штаммы разделились на продуцирующие (№№ 6246, 3158/317-318, 3184/410, 5833, 5875, 6019) и не продуцирующие токсин (№№ 5885, 5886, 6017, 6063, 6064). Изученные культуры также различались по чувствительности к сибиреязвенным фагам: все без исключения лизировались фагом RD-ph-6, но штаммы №№ 6246, 3158/317-318 и 3184/410 были слабо чувствительны к фагу Fah-ВНИИВВиМ.

По показателю LD_{50} для аутбредных белых мышей, который считается наиболее объективным, штаммы согласно классификации (19) распределились в четыре группы (табл. 4).

4. Вирулентность штаммов возбудителя сибирской язвы *Bacillus anthracis*, выделенных на территории России в 2014-2016 годах, для аутбредных белых мышей

Штамм	Показатель, спор/гол.		Оценка вирулентности
	LD_{100}	LD_{50}	
6246	$5,4\times10^2$	8	Высоковирулентный
3158/317-318	6	Не титруется	Высоковирулентный
3184/410	$1,2\times10^2$	5	Высоковирулентный
5833	30	6	Высоковирулентный
5875	20	5	Высоковирулентный
5885	$1,1\times10^3$	7	Высоковирулентный
5886	$1,7x10^2$	12	Вирулентный
6017	Не титруется	Не титруется	Авирулентный
6019	$4,7\times10^2$	19	Умеренно вирулентный
6063	150	10	Вирулентный
6064	60	21	Умеренно вирулентный

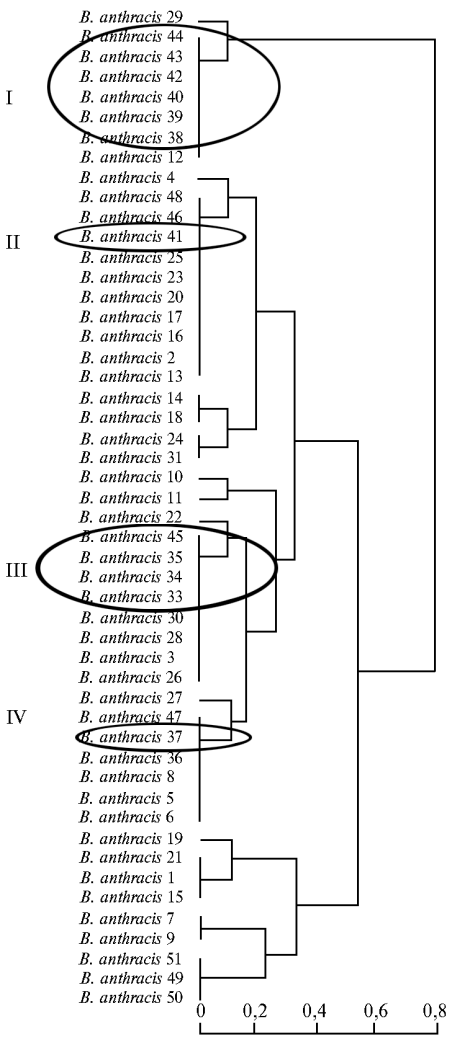
Шесть из изученных штаммов относились к высоковирулентным, по два — к вирулентным и умеренно вирулентным. Культура *B. anthracis*, выделенная от лопарской оленегонной собаки (№ 6017), не вызывала гибели аутбредных белых мышей и была отнесена к группе авирулентных. Показатель LD_{50} для изученных штаммов находился в пределах 5-37, LD_{100} — в пределах 6-2000 спор/гол. LD_{50} у штамма № 3158/317-318 опре-

делить не удалось, так как величина LD_{100} составила всего 6 спор/гол.

5. Чувствительность к антибиотикам у штаммов возбудителя сибирской язвы *Bacillus anthracis*, выделенных на территории России в 2014-2016 годах

Штамм	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
6246	S	S	MS	S	MS	MS	R	R	MS	R
3158/317-318	S	S	S	S	S	S	S	MS	S	R
3184/410	S	S	S	S	S	S	S	MS	S	R
5875	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
5885	S	S	S	S	S	MS	S	MS	S	R
5886	S	S	S	MS	MS	R	MS	MS	S	R
6019	S	S	R	S	MS	MS	MS	MS	S	R
6063	S	S	S	S	S	MS	S	MS	S	R
6064	S	MS	S	S	MS	MS	S	MS	S	R
6017	S	S	S	S	S	MS	S	S	S	R
5833	S	S	S	S	S	MS	S	S	S	R

Примечание. 1 — ампициллин, 2 — пенициллин, 3 — неомицин, 4 — энрофлоксацин, 5 — тилозин, 6 — левомицетин, 7 — стрептомицин, 8 — канамицин, 9 — тетрациклин, 10 — полимиксин Б; R (resistance) — слабочувствительные; MS (medium sensitive) — умеренно чувствительные; S (sensitive) — чувствительные.



Дендрограмма филогенетических взаимоотношений изученных штаммов *Bacillus anthracis*, построенная методом UPGMA по данным MLVA-типирования: кластер I — штаммы с условным обозначением 38-40 (№№ 5875, 5885, 5886), 42-44 (№№ 6019, 6063, 6064); кластер II — штамм с условным обозначением 41 (№ 6017); кластер III — штаммы с условным обозначением 33-35 (№№ 6264, 3158/317-318, 3184/410); кластер IV — штамм с условным обозначением 37 (№ 5833) (коллекция ГКМ-ФИЦВиМ; описание штаммов см. в табл. 1).

Девять из 11 изученных штаммов обладали природной устойчивостью к полимиксину Б, были чувствительны и высокочувствительны к левомицетину, канамицину, пенициллину, тилозину, стрептомицину, неомицину, тетрациклину, ампициллину и энрофлоксацину. Штамм № 6246 проявил устойчивость к канамицину и стрептомицину (табл. 5).

B. anthracis — один из наиболее генетически гомогенных патогенов, что затрудняет распознавание его изолятов. Для решения проблемы используют анализ множественных тандемных повторов (MLVA), позволяющий с помощью ПЦР выявлять участки бактериальной ДНК, которые в результате проскальзывания репликативной вилки подвергаются ошибочному копированию, приводящему к их укорочению или удлинению (20).

MLVA-типирование выполняли по 20 VNTR-локусам при мультиплексной амплификации препарата ДНК с последующим установлением длин флуоресцентно меченных продуктов по каждому из VNTR-локусов. Для вычисления расстояний между штаммами использовали значения числа

повторов в каждом из локусов (рис.).

По результатам MLVA-анализа изученные штаммы распределились в четыре кластера. Штаммы, полученные от северных оленей во время вспышки сибирской язвы в Ямало-Ненецком автономном округе в 2016 году, формировали I кластер, во II кластер входил один штамм (№ 6017, выделен в Ямало-Ненецком автономном округе в 2016 году от лопарской оленегонной собаки), III — образовали штаммы, выявленные в Волгоградской области в 2014 году, IV — представляла культура *B. anthracis* из почв захоронений в Республике Чувашия (см. рис., табл. 6).

6. MLVA-генотипы штаммов возбудителя сибирской язвы *Bacillus anthracis*, выделенных на территории России в 2014-2016 годах, по 20 VNTR-локусам

Штамм	1	2	3	4	5	6	7[а]	8	9	10	11	12[б]	13[б]	14	15	16[б]	17	18	19	20
III кластер																				
6246	30	31	14	9	45	13	8[в]	20	13	57	78	4	20	5	20	14[в]	4	4	14	17
3158/317-318	30	31	14	9	45	13	10	20	13	57	78	4	20	5	20	12	4	4	14	17
3184/410	30	31	14	9	45	13	10	20	13	57	78	4	20	5	20	12	4	5	14	17
I кластер																				
5875	27	27	15	10	45	14	9	16	14	53	17	3	21	3	23	9	3	5	14	15
5885	27	27	15	10	45	14	9	16	14	53	17	3	21	3	23	9	3	5	14	15
5886	27	27	15	10	45	14	9	16	14	53	17	3	21	3	23	9	3	5	14	15
6019	27	27	15	10	45	14	9	16	14	53	17	3	21	3	23	9	3	5	14	15
6063	27	27	15	10	45	14	9	16	14	53	17	3	21	3	23	9	3	5	14	15
6064	27	27	15	10	45	14	8[в]	16	14	53	17	3	21	3	23	9	3	5	14	15
II кластер																				
6017	24	30	16	12	45	13	8	20	13	57	75	–	–	4	20	–	4	4	14	16
IV кластер																				
5833	30	30	14	9	45	13	10	20	13	57	75	4	20	4	20	13	4	4	14	16

Примечание. VNTR — variable-number tandem-repeat; указано число повторов в локусе (от 1 до 45). Локусы: 1 — Geb-Bams3, 2 — Geb-Bams13, 3 — Geb-Bams22, 4 — Geb-Bams23, 5 — Geb-Bams15, 6 — VNTR32, 7 — pXO1 aat, 8 — vrrC2, 9 — Geb-Bams1, 10 — vrrC1, 11 — Geb-Bams30, 12 — VNTR17, 13 — VNTR16, 14 — vrrA, 15 — vrrB1, 16 — CL33, 17 — VNTR23, 18 — VNTR35, 19 — vrrB2, 20 — CL12; [а] — локус находится на плазмиде pX01 *B. anthracis*, [б] — полиморфные локусы находятся на плазмиде pX02 *B. anthracis*; прочерки означают, что локус не выявлен.

Эти данные подтвердили ранее установленный факт, что штаммы, выделенные в 2016 году в Ямало-Ненецком автономном округе от оленей и людей, имели один и тот же MLVA-генотип (21), а также то, что разные штаммы возбудителя сибирской язвы, циркулирующие на определенных территориях, имеют генотипы с географической приуроченностью (22-25).

У штаммов из I и III кластеров проявлились незначительные различия по 1-2 локусам внутри кластера, что может быть свидетельством их пассирования на чувствительных животных. Выявление в одной вспышке сибирской язвы (Ямало-Ненецкий автономный округ, 2016 год) штаммов, относящихся к двум различным кластерам (I и II), позволяет сделать предположение о наличии как минимум двух источников заражения животных. Эта гипотеза требует дальнейшего подтверждения.

Таким образом, по основным фенотипическим свойствам и диагностическим признакам штаммы возбудителя сибирской язвы, выделенные с 2014 по 2016 год в трех разных субъектах Российской Федерации, практически не отличались от типового штамма своего вида. Выявлена принадлежность этих штаммов к четырем MLVA20-генотипам, приуроченным к разным географическим территориям. Исключение составил штамм № 6017 *Bacillus anthracis*, выделенный от лопарской оленегонной собаки, который занимал промежуточное положение между штаммами из Волгоградской области и Республики Чувашия. Установлена высокая эпизоотическая опасность изученных штаммов (наличие факторов патогенности, экспрессирующихся in vitro, высокая вирулентность для лабораторных

животных), что подтверждает необходимость микробиологического мониторинга сибиреязвенных захоронений и падежных мест (моровых полей), а также эффективных профилактических мероприятий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ладный В.И., Ющенко Г.В. Сибирская язва на территории Российской Федерации. *Эпидемиология и инфекционные болезни*, 2009, 2: 36-40.
2. Рязанова А.Г., Аксенова Л.Ю., Буравцева Н.П., Головинская Т.М., Еременко Е.И., Цыганкова О.И., Варфоламеева Н.Г., Куличенко А.Н. Сибирская язва: эпидемиологическая и эпизоотологическая ситуация в 2015 году, прогноз на 2016 год. *Проблемы особо опасных инфекций*, 2016, 2: 24-27 (doi: 10.21055/0370-1069-2016-2-2427).
3. Рязанова А.Г., Еременко Е.И., Аксенова Л.Ю., Семенова О.В., Буравцева Н.П., Головинская Т.М., Куличенко А.Н. Оценка эпидемиологической и эпизоотологической обстановки по сибирской язве в 2016 году. Прогноз на 2017 год. *Проблемы особо опасных инфекций*, 2017, 1: 21-23 (doi: 10.21055/0370-1069-2017-1-21-23).
4. Дугаржапова З.Ф., Чеснокова М.В., Гольдапель Э.Г., Косилко С.А., Балахонов С.В. Сибирская язва в Азиатской части Российской Федерации. Сообщение 2. Современная эпизоотолого-эпидемиологическая ситуация в Сибири и на Дальнем Востоке (1985-2016 годы). *Проблемы особо опасных инфекций*, 2017, 1: 59-64 (doi: 10.21055/0370-1069-2017-1-59-64).
5. Lekota K.E., Hassim A., Mafofo J., Rees J., Muchadeyi F.C., Van Heerden H., Madoroba E. Polyphasic characterization of Bacillus species from anthrax outbreaks in animals from South Africa and Lesotho. *J. Infect. Dev. Ctries.*, 2016, 10(8): 814-823 (doi: 10.3855/jidc.7798).
6. Fouet A., Smith K.L., Keys C., Vaissaire J., Le Doujet C., Levy M., Mock M., Keim P. Diversity among French Bacillus anthracis isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 2002, 40(12): 4732-4734 (doi: 10.1128/JCM.40.12.4732-4734.2002).
7. Kolton C.B., Podnecky N.L., Shadomy S.V., Gee J.E., Hoffmaster A.R. *Bacillus anthracis* gamma phage lysis among soil bacteria: an update on test specificity. *BMC Res. Notes*, 2017, 10(1): 598 (doi: 10.1186/s13104-017-2919-8).
8. Antonation K.S., Grützmacher K., Dupke S., Mabon P., Zimmermann F., Lankester F., Peller T., Feistner A., Todd A., Herbinger I., de Nys H.M., Muyembe-Tamfun J.-J., Karhemere S., Wittig R.M., Couacy-Hymann E., Grunow R., Calvignac-Spencer S., Corbett C.R., Klee S.R., Leendertz F.H. *Bacillus cereus* biovar *anthracis* causing anthrax in Sub-Saharan Africa — chromosomal monophyly and broad geographic distribution. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2016, 10(9): e0004923 (doi: 10.1371/journal.pntd.0004923).
9. Саперкин Н.В., Алебашина Л.А., Квашнина Д.В. Устойчивость бактерий к дезинфектантам: оценка доказательной базы. *Современные проблемы науки и образования*, 2016, 5. Режим доступа: https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25429. Дата обращения: 24.12.2017.
10. Tahoun A.B.M.B., Abou Elez R.M.M., Abdelfatah E.N., Elsohaby I., El-Gedawy A.A., Elmoslemany A.M. Listeria monocytogenes in raw milk, milking equipment and dairy workers: molecular characterization and antimicrobial resistance patterns. *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, 2017, 10: 264-270 (doi: 10.1016/j.jgar.2017.07.008).
11. Morvan A., Moubareck C., Leclercq A., Hervé-Bazin M., Bremont S., Lecuit M., Courvalin P., Le Monnier A. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* strains isolated from humans in France. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2010, 54(6): 2728-2731 (doi: 10.1128/AAC.01557-09).
12. Granier S.A., Moubarek C., Colaneri C., Roussel S., Courvalin P., Brisabois A. Antimicrobial susceptibility among *Listeria monocytogenes* isolates from non-human sources in France over a ten year period. *Lirvo de actas do congress ISOPOL XVII.* Porto, 2010: 63.
13. Сомов Г.П., Зайцева Е.А., Бузолева Л.С., Глазырина Т.А., Терехова В.Е. Изоляция *Listeria monocytogenes* из различных объектов в Приморском крае и их биологические свойства. *Эпидемиологические и инфекционные болезни*, 2002, 1: 47-49.
14. Egorova I.Yu., Sevskii T.A., Selyaninov YuO. Immunobiological properties of new unencaspsulated *Bacillus anthracis* 363/11 strain. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2016, 52(8): 733-738 (doi: 10.1134/S0003683816080044).
15. Смирнов А.М., Гулюкин М.И., Субботин В.В., Колбасов Д.В., Донник И.М., Скира В.Н., Суворов А.В., Бабышова Л.В., Срибный Н.И. Методические рекомендации по комплексной оценке фенотипических признаков (гемолитической, протеолитической, лецитиназной и пигментсинтезирующей активностей, способности штаммами/изолятами продуцировать капсулу и токсин in vitro) культур *B. anthracis.* В сб.: *Новые методы исследований по проблемам ветеринарной медицины.* М., 2008: 177-186.
16. Шевченко О.В. *Протеолитическая активность возбудителя сибирской язвы. Канд. дис.* Саратов, 1999.
17. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. *Статистические методы в микробиологических исследованиях.* Л., 1962.

18. Lista F., Faggioni G., Valjevac S., Ciammaruconi A., Vaissaire J., Doujet C., Olivier G., De Santis R., Carattoli A., Ciervo A., Fasanella A., Orsini F., D'Amelio R., Pourcel C., Cassone A., Vergnaud G. Genotyping of *Bacillus anthracis* strains based on automated capillary 25-loci multiple locus variable-number tandem repeats analysis. *BMC Microbiol.*, 2006, 6: 33 (doi: 10.1186/1471-2180-6-33).
19. Шляхов Э.Н., Груз Е.В. Титрация ЛД$_{50}$ на мышах как метод определения вирулентности сибиреязвенных бацилл. В сб.: *Достижения и перспективы борьбы с сибирской язвой в СССР.* М., 1978: 97-99.
20. Keim P., Price L.B., Klevytska A.M., Smith K.L., Schupp J.M., Okinaka R., Jackson P.J., Hugh-Jones M.E. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis. J. Bacteriol.*, 2000, 182(10): 2928-2936 (doi: 10.1128/JB.182.10.2928-2936.2000).
21. Куличенко А.Н., Еременко Е.И., Рязанова А.Г., Аксенова Л.Ю., Ковалев Д.А., Писаренко С.В., Варфоломеева Н.Г., Жиров А.М., Волынкина А.С., Буравцева Н.П., Головинская Т.М., Котенева Е.А., Цыганкова О.И., Дятлов И.А., Тимофеев В.С., Богун А.Г., Бахтеева И.В., Кисличкина А.А., Миронова Р.И., Титарева Г.М., Скрябин Ю.П., Селянинов Ю.О., Егорова И.Ю., Колбасов Д.В. Биологические свойства и молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Bacillus anthracis*, выделенных во время вспышки сибирской язвы в Ямало-Ненецком автономном округе в 2016 году. *Проблемы особо опасных инфекций*, 2017, 1: 94-99 (doi: 10.21055/0370-1069-2017-1-94-99).
22. Thierry S., Tourterel Ch., Le Flиche Ph., Derzelle S., Dekhil N., Mendy Ch., Colaneri C., Vergnaud G., Madani N. Genotyping of French *Bacillus anthracis* strains based on 31-loci multi locus VNTR analysis: epidemiology, marker evaluation, and update of the internet genotype database. *PLoS ONE*, 2014, 9(6): 95-131 (doi: 10.1371/journal.pone.0095131).
23. Fasanella A., Van Ert M., Altamura S.A., Garofolo G., Buonavoglia C., Leori G., Huynh L., Zanecki S., Keim P. Molecular diversity of *Bacillus anthracis* in Italy. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, 43: 3398-340 (doi: 10.1128/JCM.43.7.3398-3401.2005).
24. Merabishvili M., Natidze M., Rigvava S., Brusetti L., Raddadi N., Borin S., Chanishvili N., Tediashvili M., Sharp R., Barbeschi M., Visca P., Daffonchio D. Diversity of *Bacillus anthracis* strains in Georgia and of vaccine strains from the former Soviet Union. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, 72: 5631-5636 (doi: 10.1128/AEM.00440-06).
25. Antwerpen M., Ilin D., Georgieva E., Meyer H., Savov E., Frangoulidis D. MLVA and SNP analysis identified a unique genetic cluster in Bulgarian *Bacillus anthracis* strains. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2011, 30(7): 923-930 (doi: 10.1007/s10096-011-1177-2).

[1]ФБГНУ Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии,
601125 Россия, Владимирская обл., Петушинский р-н,
пос. Вольгинский, ул. Академика Бакулова, стр. 1,
e-mail: yusel1@yandex.ru, iegorova@list.ru ✉, kolbasovdenis@gmail.com;
[2]ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии,
127550 Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42,
e-mail: jalex@iab.ac.ru, honeybee777@rambler.ru

Поступила в редакцию 30 октября 2017 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [*Agricultural Biology*], 2018, V. 53, № 2, pp. 404-413

PHENOTYPIC, BIOCHEMICAL AND MOLECULAR ANALYSIS OF *Bacillus anthracis* STRAINS ISOLATED DURING THE OUTBREAKS OF ANTHRAX IN THE RUSSIAN FEDERATION, 2014-2016

Yu.O. Selyaninov[1], I.Yu. Egorova[1], Ya.I. Alekseev[2], A.V. Kazantsev[2], Yu.A. Monakhova[2], D.V. Kolbasov[1]

[1]*Federal Research Center for Virology and Microbiology,* Federal Agency of Scientific Organizations, 1, ul. Akademika Bakuleva, pos. Vol'ginskii, Petushinskii Region, Vladimir Province, 601125 Russia, e-mail iegorova@list.ru (✉ corresponding author), kolbasovdenis@gmail.com, yusel1@yandex.ru;
[2]*All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology,* Federal Agency of Scientific Organizations, 42, ul. Timiryazevskaya, Moscow, 127550 Russia, e-mail jalex@iab.ac.ru, honeybee777@rambler.ru
ORCID:
Selyaninov Yu.O. orcid.org/0000-0002-4252-8714
Egorova I.Yu. orcid.org/0000-0002-5023-0897
Alekseev Ya.I. orcid.org/0000-0002-3426-7323
Kazantsev A.V. orcid.org/0000-0003-3072-9110
Monakhova Yu.A. orcid.org/0000-0002-6772-609
Kolbasov D.V. orcid.org/0000-0002-4935-0891
The authors declare no conflict of interests
Acknowledgements:
The study was carried out with the equipment of «Biotechnology» center (All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology).

Supported by the program of Federal Agency of Scientific Organizations for bioresource collections
Received October 30, 2017 doi: 10.15389/agrobiology.2018.2.404eng

Abstract

In 2014 to 2016, despite effective measures to prevent an introduction and transmission of Anthrax in the Russian Federation, there were seven outbreaks of Anthrax in Volgograd, Rostov, Belgorod, Saratov regions, the Republic of Tatarstan, and also six outbreaks in reindeer population in two districts of Yamal-Nenets Autonomous Okrug where 2657 reindeers died. In this article we present some results of comprehensive characterization of genetic, biological features and phylogenetic relationship of *Bacillus anthracis* strains isolated during the outbreaks in Volgograd region, Yamal-Nenets Autonomous Okrug and from the soils of burial in Chuvash Republic during last 3 years. Here, we differentiated 11 strains as followed from growth morphology, mobility, Gram stain procedure, capsule in vivo and in vitro formation, sporulation, proteolytic, hemolytic, lecithinase, phosphatase, glycolytic activity, protocatechuic acid production, Congo red sorption from the medium, phage sensitivity, toxicity in vitro, plasmid profile, sensitivity to antibiotics recommended for use in veterinary medicine, virulence for mice. MLVA-typing of the anthrax strains was performed for 20 VNTR loci. It was shown that the main phenotypic and diagnostic features of anthrax strains differed insignificantly and, in general, corresponded to those of a typical *B. anthracis* strain. The most significant phenotypic differences were found in asporogenous and avirulent strain *B. anthracis* № 6017 isolated in 2016 from a Lappish reindeer dog. The *B. anthracis* strains isolated during one outbreak were grouped into separate clusters, and within the cluster some strains had insignificant differences in 1-2 loci. The strains isolated from the soils of burials in the Republic of Chuvashia and from the Lappish reindeer dog during the Yamal outbreak formed separate clusters. *B. anthracis* strains showed high epizootic risk due to pathogenicity factors expressed in vitro. The tests identified the presence of capsula and toxins, high hemolytic and proteolytic activity, protocatechuic acid synthesis, and high virulence for laboratory mice (at 6-1000 spores). These results confirm the necessity of continuous monitoring and evaluation of epizootic caution of anthrax burials and case sites (frost fields), and specific preventive anti-anthrax measures.

Keywords: *Bacillus anthracis*, anthrax, strains, phenotypic properties, genotypic properties, virulence, MLVA.

Научные собрания