УДК 616.981.51:616.9-093/-098

Л.Ю. ЛУХНОВА[1], Е.К. ПАЗЫЛОВ[1], У.А. ИЗБАНОВА[1], А.Б. САРМАНТАЕВА[1], М.В. СОЛОМАДИН[1], Т.В. МЕКА-МЕЧЕНКО[1], Л.Е. НЕКРАСОВА[1], Э.Ж. БЕГИМБАЕВА[1], В.С. КАЗАКОВ[1], В.П. САДОВСКАЯ[1], В.Ю. СУЩИХ[1], М.Е. САГАТОВА[2]

[1]Казахский научный центр карантинных и зоонозных инфекций им. Масгута Айкимбаева Агентства по защите прав потребителей Республики Казахстан;

[2]Департамент Комитета Агентства по защите прав потребителей по Восточно-Казахстанской области, Республика Казахстан

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ ИДЕНТИФИКАЦИИ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ И ИХ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ОТ АТИПИЧНЫХ И БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Ежегодно на территории Казахстана во время вспышек сибирской язвы выделяют штаммы возбудителя. Расширение экономических, других связей между государствами повышает возможность заноса и распространения возбудителя на территории республики. Возбудитель сибирской язвы может быть использован в качестве биологического оружия. Для характеристики свойств штаммов, циркулирующих на территории Казахстана, дифференциации их от атипичных и близкородственных, необходимо создание электронных баз данных с молекулярными портретами штаммов, усовершенствовать схему индикации и идентификации исследования культур, провести генетическое маркирование штаммов с целью оценки географического происхождения. Результаты исследования будут использованы в учреждениях медицинского и ветеринарного профиля, занимающихся лабораторной диагностикой сибирской язвы, эпидемиологическим, эпизоотологическим мониторингом за очагами.

Ключевые слова: *штаммы сибирской язвы, фенотип, генотип, генетическая изменчивость, географическое распространение.*

Сибирская язва является особо опасной инфекцией. На территории республики зарегистрировано 1769 стационарно-неблагополучных по сибирской язве населенных пунктов, 2422 эпизоотических и эпидемических очага, где ежегодно регистрируют вспышки инфекции, выделяют штаммы *Bacillus anthracis* [1]. Существует возможность применения *B. anthracis* в качестве агента биотерроризма.

Сходство сибиреязвенного микроба с другими видами микроорганизмов этого рода по морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам создают значительные трудности в лабораторной диагностике сибирской язвы. *B. anthracis, B. cereus, B. mycoides, B. pseudomycoides, B. thuhngiensis* и *B. weihenstephanensis* составляют таксономическую группу *«Bacillus cereus»* [2]. Выявление отличительных признаков сибиреязвенного микроба и его патогенных факторов составляет основу идентификации возбудителя. Для усовершенствования методов индикации, идентификации возбудителя сибирской язвы и их дифференциации от близкородственных микроорганизмов, необходимо изучение фенотипических и генетических особенностей возбудителя сибирской язвы. Важным элементом эпидемиологического мониторинга за сибирской язвой является генетическое маркирование штаммов, осуществляемое с целью оценки географического происхождения, для идентификации сибиреязвенного микроба, при расследовании возможных актов биологического терроризма.

Решению проблем способствует анализ штаммов на основе определения наиболее специфичных генетических свойств, используя мультилокусный анализ к двум плазмидным и шести хромосомным локусам, с последующей дифференциацией штаммов по генотипам и установлением возможной связи идентифицированных генотипов *B. anthracis* с географическим происхождением [3].

Основные исследования по типированию штаммов сибиреязвенного микроба были проведены P. Keim et al. (2000), который разработал систему многолокусного анализа вариабельных тандемных повторов (MLVA), позволяющую дифференцировать штаммы *B. anthracis* по восьми маркерным локусам, из которых 6 хромосомных – vrrA, vrrB1, vrrB2, vrrC1, vrrC2, CG-3 и два плазмидных – pX01, pX02 [3]. P. Keim изучил 426 штаммов *B. anthracis*, выделенных в различных географических регионах и определил шесть генетических групп возбудителя сибирской язвы A1, A2, A3, A4, B1, B2 (с подгруппами A1a, A1в, A3a, A3в), которые объединил в две большие филогенетические группы A и B. К группе A относятся штаммы *B. anthracis,* выделенные в различных странах – США, Италия, Франция, Германия и других странах, где регистрируют вспышки сибирской язвы среди животных и людей. Штаммы *B. anthracis*, отнесенные к группе B, были выделены, в основном, в Южной Африке.

Цель исследований – изучение фенотипической и генетической вариабельности штаммов сибирской язвы B. anthracis, разработка методических подходов для совершенствования диагностики сибиреязвенной инфекции и эпидемиологического анализа, установление возможной связи идентифицированных генотипов *B. anthracis* с географическим происхождением.

Материал и методы

Культурально-морфологические, биохимические, генетические свойства коллекционных штаммов, выделенных из различных объектов в очагах сибирской язвы в 1952 – 2010 годах, изучали согласно методическим рекомендациям [4, 5, 6].

Результаты

В коллекции КНЦКЗИ имеются вирулентные и вакцинные штаммы *B. anthracis,* выделенные в эпизоотических и эпидемических очагах сибирской язвы от больных сибирской язвой людей, сельскохозяйственных животных и из объектов внешней среды во время вспышек сибирской язвы.

Результаты изучения фенотипической и генотипической вариабельности природных и вакцинных штаммов сибирской язвы по основным тестам идентификации и дополнительным признакам показали, что в 84,3% фенотипические свойства штаммов сибирской язвы типичные. Выявлена вариабельность у природных и вакцинных штаммов, в 15,7% были отличия по одному или двум признакам (отсутствие капсулы, токсина, летального фактора, вирулентности). В 3,7% случаев штаммы

B.anthracis не продуцируют капсулу в атмосфере с повышенным содержанием CO_2, 2,2% – не продуцируют токсин, у 14,8% штаммов отсутствует ген *lef*, в 5,2% случаев у штаммов отмечена сниженная вирулентность (DCL для белых мышей 10^6-10^9 спор/мл), в 1% случаев зарегистрирован отрицательный тест «жемчужное ожерелье», отсутствие генов cap и pag. Отклонения от типичных свойств выявлены у штаммов *B. anthracis,* выделенных от людей. По литературным данным, атипичных штаммов с такими и иными, отличающимися от типового штамма характеристиками, может быть около 10%. Как раз они являются трудными объектами для идентификации, так как лишены некоторых опорных признаков, позволяющих дифференцировать их от близкородственных бацилл группы «*Bacillus cereus*». Отдельные сообщения свидетельствуют о том, что результаты даже нескольких предварительных идентификационных тестов не всегда могут быть надежными.

В результате проведенной работы с использованием молекулярного типирования (МЛВА-8) коллекционных штаммов *B. anthracis*, включая вакцинные, удалось определить полный генотип по схеме P. Keim et al. (2000) по шести хромосомным и двум плазмидным локусам 127 штаммов, что составляет 84,3% от общего количества [3].

Изучение штаммов сибиреязвенного микроба позволило определить, что в очагах инфекции Казахстана циркулируют штаммы *B. anthracis* Казахстана четырех генотипов (А1а, А4, А3в, А5). Штаммы сибирской язвы, относящиеся к генотипу А1а составляют 81,8%, А4 – 1,5%, А3в -12,5%, А5 – 3,9%.

Штаммы сибирской язвы имеют различия внутри генотипов по восьми маркерам: pXO1, pXO2, CG_3, vrrA, $vrrC_1$, $vrrC_2$, $vrrB_1$ $vrrB_2$, что позволило поделить их на 11 генетических вариантов – KZ – 1-11.

Определены размеры хромосомных локусов, характерные для возбудителя сибирской язвы, что позволит выявлять атипичные штаммы, дифференцировать штаммы возбудителя сибирской язвы от близкородственных бацилл. Размеры хромосомных и плазмидных ампликонов: vrrA – 296 – 320; $vrrB_1$ – 223-224; $vrrB_2$ – 152 – 156; $vrrC_1$ – 535 –619; $vrrC_2$ -528- 602; CG-3 – 147– 152; pXO1 – 123 – 135; pXO2 – 134–138; свидетельствуют о принадлежности штаммов к виду *B. anthracis.*

Результаты МЛВА-8 с пробами близкородственных бацилл показали, что ДНК этих штаммов либо не амплифицировались с праймерами ко всем хромосомным локусам, либо генерировали ампликоны с праймерами к отдельным локусам, но при этом размеры фрагментов и их совокупности отличались от размеров, описанных для *B. anthracis,* а амплификация с праймерами к плазмидным локусам не происходила.

Результаты генотипирования показали, что большинство штаммов, выделенные на территории Казахстана, имеют признаки, характерные для генетической группы «А», которая широко распространена в мире. Подобные штаммы выделены в Туркмении, России, Китае, Турции, Европе, на западе США, Канаде и других странах [3, 7, 8].

Штаммы, относящиеся к генетической группе «А», генотипу А1а, выделены в Южно-Казахстанской, Западно-Казахстанской, Восточно-Казахстанской, Жамбылской, Алматинской, Кызылординской, Павлодарской, Атырауской областях.

Генотип А5 имеют штаммы *B. anthracis,* выделенные только из ЮКО. Стабильность генетических признаков штаммов доказывается тем, что в этой группе два штамма возбудителя сибирской язвы были выделены в ЮКО в 1961 году, а три штамма – летом 2000 года.

Генотип А4 имеют штаммы, выделенные в ЮКО в 1962 г. из селезенки МРС и в 1981 г. в Атырауской области от верблюда. Генетически эти штаммы близки к штаммам *B. anthracis*, циркулирующим в Пакистане и западной части Китая. Для генотипа А4 характерны штаммы *B. anthracis,* выделяемые из некоторых регионов США, Европы, Норвегии, Азии. В генотип А4 включен штамм *B. anthracis Vollum*, который используется в научных разработках в военных лабораториях Великобритании.

Генотип А3b имеют штаммы, выделенные в ВКО в 2004 году и в ЗКО в 2009 году. В этот генотип входит значительная группа штаммов *B. anthracis*, в которой P. Keim удалось выделить 39 из 89 генотипов. Подобные штаммы были выделены в очагах Крюгеровского национального парка (ЮАР), в Австралии, Турции, Южной Африки. К этой же группе также относятся вакцинные штаммы *B. anthracis Sterne* и *V770-NPR*. Штаммы возбудителя сибирской язвы А3в встречаются в Монголии и Китае (рис.1).

Наиболее выраженным генетическим разнообразием отличаются ЮКО, ВКО, ЗКО, Атырауская области. Это может быть связано с сезонными перегонами сельскохозяйственных животных из одной области в другую, по историческим торговым и кочевым маршрутам.

Протяженность государственной границы Республики Казахстан с Российской Федерацией 7200 километров, Туркменистаном 400 километров, Республикой Узбекистан 2150 километров, Китайской Народной Республикой 1660 километров. Ежегодно в этих странах регистрируют заболевания сельскохозяйственных животных и людей. В России групповые и единичные случаи заболевания регистрируют в Омской, Волгоградской, Астраханской областях, граничащих с Казахстаном. Возможен завоз мяса, инфицированного спорами сибирской язвы, на территорию Казахстана из этих стран. Этим можно объяснить генетическое разнообразие штаммов сибирской язвы, зарегистрированных в Казахстане.

Анализ генотипирования штаммов выявил связь идентифицированных генотипов с источником и временем выделения штаммов возбудителя сибирской язвы. Штаммы *B. anthracis*, выделенные во время одной вспышки, имеют один генотип и генетический вариант, независимо от источника выделения (человек, животное).

Обсуждение

Проведенное сравнительное изучение фенотипических и молекулярно-биологических свойств типичных, атипичных и близкородственных бацилл возбудителя сибирской язвы позволило сделать заключение как о внутривидовой вариабельности, так и о межвидовых сходствах бацилл, циркулирующих на территории Казахстана.

Оптимизации процессов идентификации и дифференциации штаммов возбудителя сибирской язвы будет способствовать мультилокусный анализ (МЛВА-8) по шести хромосомным и двум плазмидным локусам.

Определены размеры хромосомных локусов, характерные для возбудителя сибирской язвы, что позволит определить атипичные штаммы, дифференцировать штаммы возбудителя сибирской язвы от близкородственных бацилл.

Эти данные будут использованы для установления источника инфекции, дифференциации штаммов, выделенных в очагах инфекции природных вспышках сибирской язвы, определения возможности заноса и распространения возбудителя сибирской язвы на территорию республики, при возможном использовании штаммов в качестве биологического оружия. Будет усовершенствована схема индикации и идентификации возбудителя сибирской язвы.

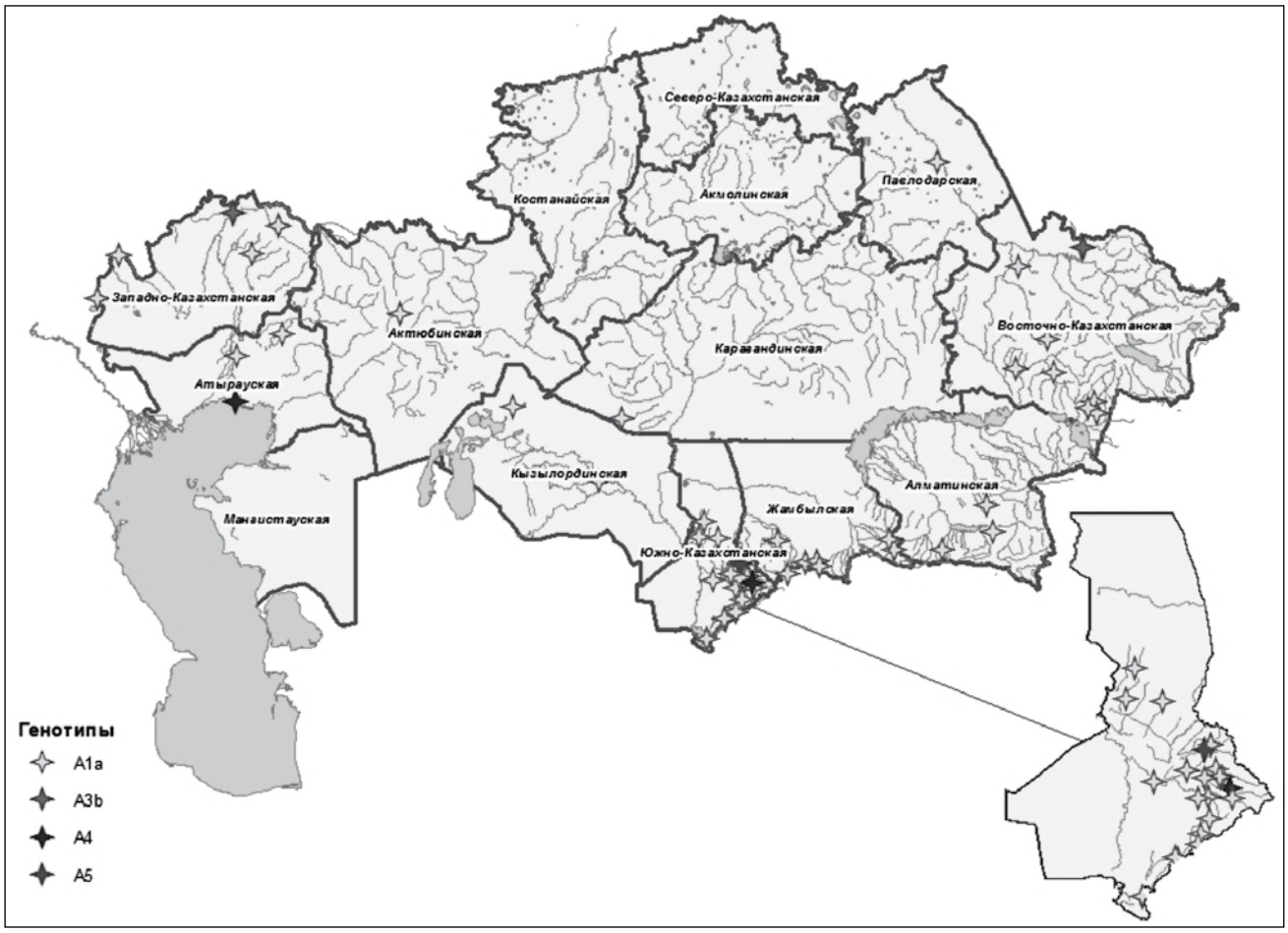

Рисунок 1 – Места выделения штаммов сибирской язвы на территории Казахстана в период с 1952 по 2014 годы

Выводы

На основании проведенных исследований были сделаны следующие выводы:

1. На территории Казахстана в большинстве случаев циркулируют типичные штаммы сибирской язвы, имеющие плазмидные и хромосомные локусы вирулентности. Размеры хромосомных и плазмидных ампликонов: vrrA – 296 – 320; $vrrB_1$ – 223-224; $vrrB_2$ – 152 – 156; $vrrC_1$ – 535 –619; $vrrC_2$ – 528- 602; CG-3 – 147– 152; pXO1 – 123 – 135; pXO2 – 134–138 свидетельствуют о принадлежности штаммов к виду *B. anthracis* и позволят определять атипичные штаммы, дифференцировать штаммы возбудителя сибирской язвы от близкородственных бацилл.

2. ДНК близкородственных бацилл не амплифицируются с праймерами ко всем хромосомным локусам, или генерируют ампликоны с праймерами к отдельным локусам, но при этом размеры фрагментов отличаются от размеров, описанных для *B. anthracis,* а амплификация с праймерами к плазмидным локусам не происходит.

3. Отклонения от типичных свойств выявлены у штаммов *B.anthracis,* выделенных от людей. В 2,2% штаммы не продуцируют токсин, 3,7% штаммов *B.anthracis* не продуцируют капсулу, в 5,2% случаев у штаммов отмечена сниженная вирулентность, в 1% случаев отсутствуют гены pag и cap, отрицательный тест «жемчужное ожерелье». Отсутствие летального фактора *lef* у 14,8% штаммов не связано с источником выделения возбудителя сибирской язвы. Выявлены штаммы, перспективные в качестве вакцинных.

4. Штаммы сибирской язвы, циркулирующие на территории Казахстана, различаются как по генотипам (A1a – 81,8%, A4 – 1,5%, A3в – 12,5 %, A5 – 3,9%), так и внутри генотипа (KZ – 1-11).

5. Определена связь идентифицированных генотипов с географическим происхождением. На большей части территории республики (ЮКО, ВКО, ЗКО, Жамбылская, Атырауская, Кызылординская, Павлодарская, Алматинская области) циркулируют штаммы генотипа A1a. Только в ЮКО циркулируют штаммы генотипа A5. Только на территории ВКО и ЗКО выявлены штаммы с генотипом A3в. На территории ЮКО и Атырауской области циркулируют штаммы A4 генотипа, что связано с сезонными перегонами сельскохозяйственных животных из одной области в другую по историческим торговым и кочевым маршрутам.

6. Установление генотипа штаммов, циркулирующих на территории Казахстана, генетических групп будет использовано в эпидемиологическом мониторинге при расследовании вспышек сибирской язвы, для усовершенствования схемы индикации и идентификации возбудителя сибирской язвы, при возможном использовании штаммов в качестве биологического оружия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1 Лухнова Л.Ю., Пазылов Е.К., Мека-Меченко Т.В., Сармантаева А.Б., Избанова У.А., Мырзабеков А.М., Тулеуов А.М., Оспанова Г.М. Анализ эпизоотического и эпидемического процессов по сибирской язве в Казахстане в 2002-2012 годах. «Жизнь без опасностей». – Москва, т.VIII, №2. – 2013. – С. 66-72

2 Еременко Е.И. Группа бактерий «BACILLUS CEREUS» – Проблемы идентификации и таксономии // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2008. – №3. – С. 57–60

3 Keim P., Price L., Klevytska A. M., Smith K. L., J. M. Schupp, R. Okinaka, P. J.Jackson, M.E.Hugh– Jones. Multiple – locus Variable- Number Tandem Repeat Analysis Reveals Genetic Relationships within *Bacillus anthracis* // Journal of Bacteriology. – 2000. – №12 – P. 2928-2936.

4 Методические рекомендации «Лабораторная диагностика сибирской язвы у людей». – Астана, 2004. – 12 с.

5 Методические рекомендации «Обнаружение возбудителя сибирской язвы в продуктах и сырье животного происхождения и объектах внешней среды». – Астана, 2004. – 11 с.

6 Лухнова Л.Ю., Пазылов Е.К., Мека-Меченко Т.В. и др. Методические рекомендации «Молекулярно-генетические методы в лабораторной диагностике сибирской язвы. – Алматы, 2013. – 37 с.

7 Цыганкова О.И. Фенотипическая и генотипическая вариабельность штаммов сибиреязвенного микроба (теоретические и практические аспекты): автореф. дисс. … докт. мед. наук. – Ставрополь, 2007. – 45 с.

8 Лухнова Л.Ю. Современный эпиднадзор за сибирской язвой. Автореф. дисс. … докт. мед. наук. – Алматы, 2007. – 49 с.

Т Ұ Ж Ы Р Ы М

Л.Ю. ЛУХНОВА[1], Е.К. ПАЗЫЛОВ[1], У.А. ИЗБАНОВА[1], А.Б. САРМАНТАЕВА[1], М.В. СОЛОМАДИН[1], Т.В. МЕКА-МЕЧЕНКО[1], Л.Е. НЕКРАСОВА[1], Э.Ж. БЕГИМБАЕВА[1], В.С. КАЗАКОВ[1], В.П. САДОВСКАЯ[1], В.Ю. СУЩИХ[1], М.Е. САГАТОВА[2]

[1]Қазақстан Республикасының (ҚР) тұтынушылар құқығын қорғау бойынша Агенттіктің «Масғұт Айқымбаев атындағы карантиндік және зооноздық індеттердің қазақ ғылыми орталығы» РМКК;

[2]«ҚР Шығыс-Қазақстан облысы бойынша тұтынушылар құқығын қорғау бойынша Агенттік Комитетінің Департаменті» мемлекеттік мекемесі

СІБІР ЖАМАНДАТЫН ҚОЗДЫРҒЫШ ШТАММЫН ЖЕТІЛДІРУ ЖӘНЕ ОЛАРДЫ МӨЛШЕРДЕН АУЫТҚУ ЖӘНЕ ЖАҚЫН ТУЫС МИКРОАҒЗАЛАРДАН ЖІКТЕУ

Қазақстанда адамдар және ауылшаруашылық малдары арасында сібір жамандатының таралуы тіркелді, *Bacillus anthracis штаммы* ерекшеленді. Микробтың басқа микроағзалардың түрімен ұқсастығы диагностикада қиындықтарды тудырады.

Зерттеу мақсаты: *B. anthracis*сібір жамандаты штаммының зерделеу, қоздырғышты диагностикалау үшін әдістемелік амалдарды әзірлеу, *B. Anthracis*генотиптерінің географиялық шығу тегімен байланысын орнату.

Материалдар және әдістер: 1952-2010 ж.ж. сібір жамандаты ошақтарында әр түрлі объектілерден бөлінген штаммының генетикалық мәдени-морфологиялықерекшелігі әдістемелік ұсыныстарға сәйкес зерттелді

Нәтижелер: ҚЗІҚҒО топтамасында 1952 жылдан 2014 жылға дейін ерекшеленген *B. anthracis* штаммы бар. Зерттеу нәтижелері сібір жамандаты штаммдарының фенотиптік ерекшеліктерінің 84,3% типтілікті екендігін көрсетті. Локустардың өлшемі анықталды, ол мөлшерден шығу штаммын белгілеуге, қоздырғышты жақын туысты бацилладан жіктеуге көмектеседі. Қазақстанның сібір жамандаты ошақтарында А1а, А5, А4, А3в – төрт генотипті *B. Anthracis*штаммы жайылады.

Талқылау: Қазақстан аумағында жайылатын штамм генотиптерін анықтау сібір жамандатының таралуын зерттеу кезіндегі эпидемиологиялық мониторингта пайдаланылады.

Қорытынды: 1) Қазақстан аумағында көп жағдайда плазмидті және хромосомдық локустары бар сібір жамандатының типті штаммдары жайылады

2) Қазақстан аумағында жайылатын сібір жамандатының штаммдары генотиптер (А1а, А4, А3в, А5) бойынша және де генотип ішіндегілер бойынша (KZ – 1-11) ерекшеленеді.

3) географиялық шығу тегімен теңестірілген генотиптермен байланысын анықтау

Негізгі сөздер: *сібір жамандатының штаммы, фенотип, генотип.*

S U M M A R Y

L.Yu. LUKHNOVA[1], E.K. PAZYLOV[1], U.A. IZBANOVA[1], A.B. SARMANTAYEVA[1], M.V. SOLOMADIN[1], T.V. MEKA-MECHENKO[1], L.E. NEKRASOVA[1], E.Zh. BEGIMBAYEVA[1], V.S. KAZAKOV[1], V.P. SADOVSKAYA[1], V.Yu. SUSHCHIKH[1], M.E. SAGATOVA[2]

[1]Republican State-owned Public Enterprise "MasgutAikimbayevKazakh Scientific Center of Quarantine and Zoonotic Diseases" under the Agency for Consumer Right Protection of the Republic of Kazakhstan (RK);

[2] State Institution "Committee Department of the Agency for Consumer Right Protection on the East Kazakhstan region" RK;

IMPROVED METHODS OF IDENTIFICATION OF STRAINS OF BACILLUS ANTHRACIS AND THEIR DIFFERENTIATION FROM ATYPICAL AND CLOSELY RELATED MICROORGANISMS

In Kazakhstan outbreaks of anthrax among humans and farm animals are recorded and *Bacillus anthracis* strains are isolated. The microbe similarity with other species of microorganisms creates difficulties in diagnosis.

The purpose of the research: tostudy variability of *B. anthracis* anthrax strains, to develop methodological approaches for pathogen diagnostics, to identify the relationship of *B. anthracis* genotypes with geographical origin.

Materials and Methods

Cultural-morphological, genetic properties of the strains isolated from different objects in the outbreaks of anthrax in 1952 – 2010, were studied according to the methodological recommendations.

Outcomes

The KSCQZD's collection has *B. anthracis* strains isolated from 1952 to 2014. The study results showed that in 84.3%, the phenotypic properties of anthrax strains are typical. The sizes of the loci are defined that will allow to identify atypical strains,to differentiate the pathogen from closely related bacilli. In anthrax outbreaks in Kazakhstan,four genotypes of *B. anthracis* strains, such as A1a, A5, A4, A3b circulate.

Discussion

Identificationof the genotype of strains circulating in Kazakhstan, will be used in epidemiological monitoring in the investigation of anthrax outbreaks.

Findings

1) In the territory of Kazakhstan, in most cases, typical anthrax strains circulate having plasmid and chromosomal loci.

2) Anthrax strains circulating in the territory of Kazakhstan, differ both in genotypes (A1a, A4, A3b, A5) and within the genotype (KZ – 1-11).

3) A relation of the identified genotypes with the geographical origin is established.

Keywords: *anthrax strains, phenotype, genotype.*