

Результаты исследования биологических и генетических свойств сибиреязвенных изолятов эпизоотии 2016 года в Ямало-Ненецком автономном округе

Д.Л. Павлов, Н.В. Онучина, А.В. Кузнецовский, О.О. Фоменков, А.С. Туманов

Филиал федерального государственного бюджетного учреждения
«48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны
Российской Федерации, 610000, Российская Федерация, г. Киров,
Октябрьский проспект, д. 119

Поступила 15.12.2016 г. Принята к публикации 02.03.2017 г.

В статье представлены результаты исследований изолятов *Bacillus anthracis*, отобранных в ходе ликвидации эпизоотии сибирской язвы в Ямало-Ненецком автономном округе летом 2016 г. Изученные изоляты высоко чувствительны к средствам общей экстренной профилактики (доксциклину, пefлоксацину и рифампицину), а также к основным средствам специальной экстренной профилактики и этиотропного лечения сибирской язвы (ампициллину, ципрофлоксацину, амикацину, гентамицину). Они обладают высокой вирулентностью в отношении белых мышей. Величина LD_{50} составляла от 5 до 7 спор, а средняя продолжительность жизни животных с момента инфицирования до гибели не превышала 3,6 суток. Результаты VNTR-типирования позволили констатировать, что генотип изолятов *B. anthracis*, вызвавших эпизоотию сибирской язвы среди оленей Ямала, не является экзотичным для России, подтверждением чему является наличие в Государственной коллекции микроорганизмов штамма с идентичным VNTR-генотипом. По всем исследованным VNTR-локусам ямальские изоляты *B. anthracis* совпадают со штаммом *B. anthracis* 1051, выделенным в 1935 г. Уфимской ветлабораторией из трупа лошади, что свидетельствует о существовании на территории нашей страны (Южного Урала) устойчивых почвенных очагов *B. anthracis* с данным генотипом.

Ключевые слова: сибирская язва; эпизоотия; Ямало-Ненецкий автономный округ; штамм; диагностика.

Библиографическое описание: Павлов Д.Л., Онучина Н.В., Кузнецовский А.В., Фоменков О.О., Туманов А.С. Результаты исследования биологических и генетических свойств сибиреязвенных изолятов эпизоотии 2016 года в Ямало-Ненецком автономном округе // Вестник войск РХБ защиты. 2017. Т. 1. № 1. С. 23–32.

В июле–августе 2016 г. мы стали свидетелями эпизоотии сибирской язвы северных оленей на территории Ямалского района Ямало-Ненецкого автономного округа (ЯНАО). За несколько недель был нанесен многомиллионный ущерб оленеводству, заболели люди, умер 12-летний подросток, пало около 2350 животных. Современная Россия не знала вспышки сибирской язвы среди животных таких мас-

штабов. Ликвидация последствий эпизоотии потребовала привлечения специалистов различных министерств и ведомств. По просьбе губернатора ЯНАО к борьбе с сибирской язвой были привлечены личный состав и техника войск РХБ защиты, в том числе и специалисты 48 ЦНИИ Минобороны России и его филиалов. Проведенные мероприятия по утилизации павших животных (сжигание) и дезинфекции

мест их захоронения позволили значительно снизить уровень контаминации возбудителем сибирской язвы окружающей среды.

В филиал 48 ЦНИИ Минобороны России (г. Киров) для выделения чистой культуры возбудителя и детального изучения его свойств были отобраны и доставлены 33 пробы, содержащих аутопсийный материал, смывы с объектов, а также образцы почвы и воды, подозрительные на зараженность (контаминацию) *Bacillus anthracis*.

Цель данной работы — освещение результатов исследования биологических и молекулярно-генетических свойств сибиреязвенных изолятов, полученных в ходе ликвидации сибиреязвенной эпизоотии 2016 г. в ЯНАО.

Материалы и методы

В работе использовали пробы органов и тканей северных оленей (*Rangifer tarandus*), павших во время эпизоотии сибирской язвы в ЯНАО летом 2016 г., а также образцы почвы, воды и смывы с объектов окружающей среды, подозрительные на зараженность (контаминацию) *B. anthracis*.

В ходе идентификации и изучения выделенных из проб микробных культур *B. anthracis* в качестве референс-микроорганизмов использовали штаммы из Государственной коллекции микроорганизмов филиала 48 ЦНИИ Минобороны России (г. Киров). Характеристика использованных штаммов приведена в таблице 1.

Подготовку проб к анализу методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) проводили с использованием набора реагентов «М-Сорб» производства ЗАО «Синтол» в соответствии с инструкцией по применению [1].

Для выявления ДНК возбудителя сибирской язвы в пробах использовали ме-

дицинское изделие — набор реагентов «ОМ-Скрин-Сибирская язва-РВ» производства ЗАО «Синтол» [2]. Реакционные смеси для амплификации в режиме реального времени ДНК возбудителя сибирской язвы компоновали в соответствии с инструкцией фирмы-изготовителя. Для получения достоверного результата каждую пробу исследовали в ПЦР в трех повторях. Амплификацию, детекцию и учет результатов ПЦР анализа в режиме реального времени осуществляли согласно с Инструкцией к набору реагентов и Руководством по эксплуатации АНК-32 [2, 3].

Окрашивание мазков по Цилю-Нильсену и Граму, капсулообразование, оценку патогенности и показатель вирулентности для лабораторных животных, чувствительность к видоспецифическому сибиреязвенному бактериофагу, тест «жемчужное ожерелье» с пенициллином, фосфатазную, протеолитическую, гемолитическую и лецитиназную активности проводили согласно МУК 4.2.2413-08 Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы [4].

В качестве питательной среды для спорообразования использовали КГ-агар, производства «HiMedia» (Индия). Для приготовления споровых культур *B. anthracis* от 10 до 15 отдельных колоний каждого изолята ресуспендировали в 25 мл жидкой питательной среды и инкубировали при температуре $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24 ч. Выросшими бульонными культурами в количестве от 6 до 8 мл засеивали матрасы со средой для спорообразования, которые инкубировали при $(33 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 4 сут, после чего смывали дистиллированной водой. Процесс спорообразования контролировали ежедневно просмотром мазков, окрашенных по Цилю-Нильсену. При обнаружении в мазках от 85 до 90 % спор культуры смывали с поверхно-

Таблица 1 — Характеристика штаммов микроорганизмов, использованных в экспериментальных исследованиях

Вид	Наименование штамма	Плазмидный состав	Происхождение или источник получения штамма
<i>Bacillus anthracis</i>	СТИ-1	pXO1	Штамм выделен в 1940 г. Н.Н. Гинсбургом путем высева культуры штамма «Красная Нива» на чашки со свернутой нормальной лошадиной сывороткой
<i>Bacillus anthracis</i>	Ч-7	pXO1, pXO2	Штамм выделен в 1947 г. А.Л. Тамариным в Кировской областной больнице от больного человека
<i>Bacillus anthracis</i>	1051	pXO1, pXO2	Штамм выделен в 1935 г. Уфимской ветеринарной лабораторией из трупа лошади
<i>Bacillus anthracis</i>	8	—	Штамм дикого типа, получен из Коллекционного центра СтавНИПЧИ 11.04.2003 г.

сти агара дистиллированной водой. В полученные споровые суспензии добавляли глицерин до конечной концентрации 30 %. Приготовленные споровые культуры хранили при температуре $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ и в дальнейшем использовали для оценки ЛД_{50} .

При определении показателя ЛД_{50} использовали беспородных белых мышей массой 18–20 г. Животных заражали подкожно в расчетных дозах, составляющих 1, 5, 25 и 125 живых спор. За зараженными животными наблюдали в течение 10 сут. Для определения специфичности гибели погибших животных вскрывали и проводили высевы из селезенки (методом «отпечатка») на чашки Петри с бикарбонатной средой. Чашки инкубировали в атмосфере CO_2 при температуре $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24 ч. Животное считали погибшим от сибирской язвы в случае обнаружения на поверхности агара роста, характерного для сибиреязвенного микроба.

Чувствительность к антибактериальным препаратам определяли методом диффузии в агар (с использованием бумажных дисков, насыщенных антибиотиками, изготовленных НИЦФ, г. Санкт-Петербург).

Препараты ДНК для мультилокусного VNTR-типирования микробных культур *B. anthracis* получали с использованием Набора реагентов для выделения геномной ДНК на колонках «К-Сорб» производства ЗАО «Синтол» в соответствии с инструкцией по применению [5].

Генетическое типирование исследуемых культур проводили методом мультилокусного VNTR-анализа по локусам из числа описанных Keim et al. [6] и Le Fleche et al. [7].

Разделение продуктов амплификации проводили в нативных 6–12 % полиакриламидных гелях (ПААГ) в зависимости от размера ожидаемых аллельных вариантов и единицы повтора исследуемого VNTR-локуса. В качестве маркеров ДНК, параллельно с анализируемыми амплификатами, использовали гомологичные нуклеотидные последовательности. Определение размера амплифицированных фрагментов проводили путем сравнения длины их пробега с пробегом гомологичной маркерной ДНК после окрашивания геля бромистым этидием (рабочая концентрация раствора 0,5 мкг/мл).

Результаты и обсуждение

На первом этапе из поступивших на исследование проб готовили мазки для микроскопии с последующим их окрашиванием по Граму. На рисунке 1 в качестве примера представлены фотографии мазков-отпечатков из проб биологического материала.

В мазках-отпечатках из органов и тканей павших животных просматривались крупные

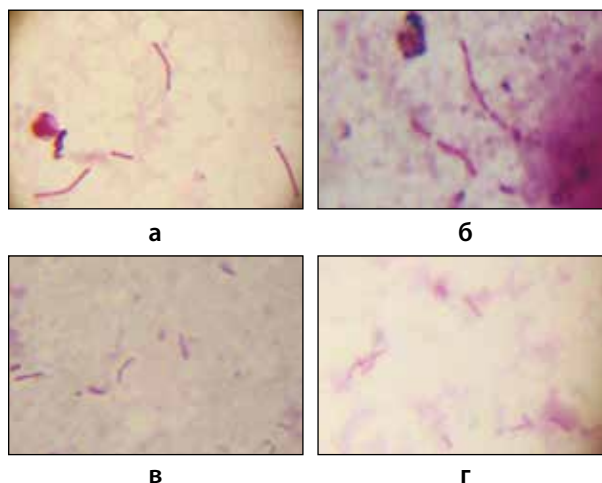


Рисунок 1 — Микроскопическая картина мазков-отпечатков, приготовленных из проб биологического материала от павших во время эпизоотии сибирской язвы в июле – августе 2016 г. в ЯНАО животных
(а – ухо; б, в – селезенка; г – печень (окраска по Граму, $\times 1350$))

грамположительные палочки, расположенные в виде цепочек, состоящих чаще всего из двух–четырех члеников.

Одновременно с проведением световой микроскопии мазков проводили исследование поступивших проб методом ПЦР-РВ. Положительный результат реакции подтверждал наличие в пробах специфических фрагментов ДНК *B. anthracis*. Исключение составили две пробы воды из мест водопоев животных (отрицательный результат ПЦР-РВ).

В дальнейших исследованиях нами использовались только положительные в ПЦР-РВ пробы.

Чистую культуру возбудителя сибирской язвы выделяли параллельно двумя методами: бактериологическим (путем посева нативных проб на селективные плотные и в жидкие питательные среды) и биологическим (через заражение исходным материалом лабораторных животных).

Для проведения бактериологического исследования на чашки Петри с плотной питательной средой, содержащей полимиксин В, из образцов тканей павших животных были сделаны мазки-отпечатки. Через 8–10 ч инкубирования на поверхности агара наблюдали рост микроорганизмов. Фотографии некоторых микроколоний на плотной питательной среде с типичным для возбудителя сибирской язвы характером роста представлены на рисунке 2.

При просмотре через микроскоп с увеличением в 100 раз отдельные колонии заметно отличались от других микроорганизмов. Их периферия выделялась неровными краями с отходящими от них волнистыми отростками, напоминающими так называемую «львиную

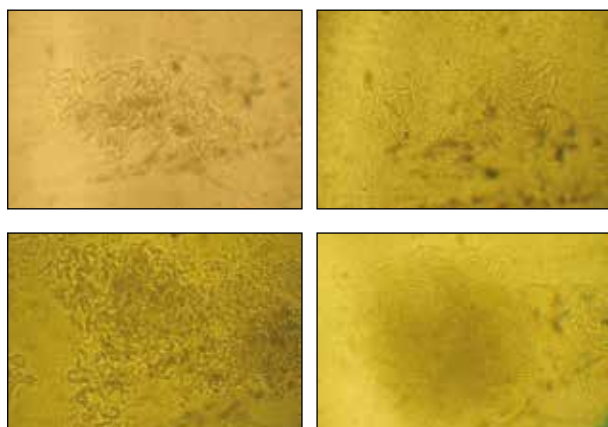


Рисунок 2 — Световая микроскопия отдельных колоний (микроколоний) с типичным для возбудителя сибирской язвы характером роста на плотной питательной среде ($\times 100$)



Рисунок 3 — Микроскопия мазков по Граму, приготовленных из агаровой (а) и бульонной (б) микробных культур через 18–20 ч роста ($\times 1350$)

гриву» или «голову медузы», характерные для *B. anthracis*.

Типичные для возбудителя сибирской язвы колонии отбирали стерильной петлей и рассеивали в жидкой и на плотной питательных средах до истощения с целью получения чистой культуры. Во всех случаях через 18–20 ч инкубирования при температуре $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ наблюдали характерный для *B. anthracis* рост. Для изучения морфологии клеток отобранных микробных культур и подтверждения их принадлежности к виду *B. anthracis* делали мазки для микроскопии с последующей окраской по Граму и Циллю–Нильсену. Результаты микроскопии представлены на рисунке 3.

В мазках по Граму выявлялись крупные грамположительные палочки с обрубленными внутренними и слегка закругленными свободными концами, расположенные в виде длинных цепочек, напоминающих «бамбуковую трость», что характерно для сибиреязвенного микроба.

В мазках, окрашенных по Циллю–Нильсену, также просматривались крупные бактериальные клетки, расположенные в цепочках. В отдельных цепочках часть клеток находилась в процессе спорообразования, о чем свидетельствовало наличие внутри бактериальных клеток центрально расположенных проспор.

Для окончательного подтверждения видовой принадлежности проводили исследование выделенных микробных культур методом ПЦР-РВ. Протокол анализа препаратов ДНК пяти микробных культур с использованием медицинского изделия ЗАО «Синтол» – набор реагентов «ОМ-Скрин-Сибирская язва-РВ», представлен на рисунке 4.

Результаты ПЦР-РВ во всех пяти случаях подтвердили видовую принадлежность выделенных микробных культур и наличие у них

нуклеотидных последовательностей детерминант факторов патогенности возбудителя сибирской язвы, локализованных на плаزمиде рХО1 и рХО2, что характерно для вирулентных штаммов *B. anthracis*.

Дальнейшие исследования продолжили с изучения биологических свойств выделенных культур *B. anthracis*. Оценку патогенности проводили на золотистых хомячках в сравнении с культурой тест-штамма Ч-7 *B. anthracis*. Животных заражали бактериальной суспензией каждого штамма во внутреннюю поверхность бедра подкожно в объеме 0,5 мл. В процессе наблюдения за зараженными животными было установлено, что все взятые в опыт золотистые хомячки погибли через 42 ч после инфицирования. При вскрытии погибших животных обнаруживались студенистый инфильтрат в области введения заражающего материала и кровенаполненная селезенка. Других поражений внутренних органов выявлено не было. В мазках-отпечатках внутренних органов, окрашенных по Граму, выявлялись грамположительные палочки, расположенные в основном поодиночке и попарно, а также в виде коротких обрубленных нитей с просветлениями между отдельными клетками.

При высеве из внутренних органов погибших животных на чашках с бикарбонатной питательной средой через 24 ч инкубирования в атмосфере CO_2 во всех случаях обнаруживались типичные для вирулентных штаммов *B. anthracis* слизистые колонии, сходные по морфологии с колониями тест-штамма Ч-7. В качестве примера на рисунке 5 представлены фотографии роста отдельных колоний S-формы микробных культур *B. anthracis* после пассажа через организм золотистого хомячка.

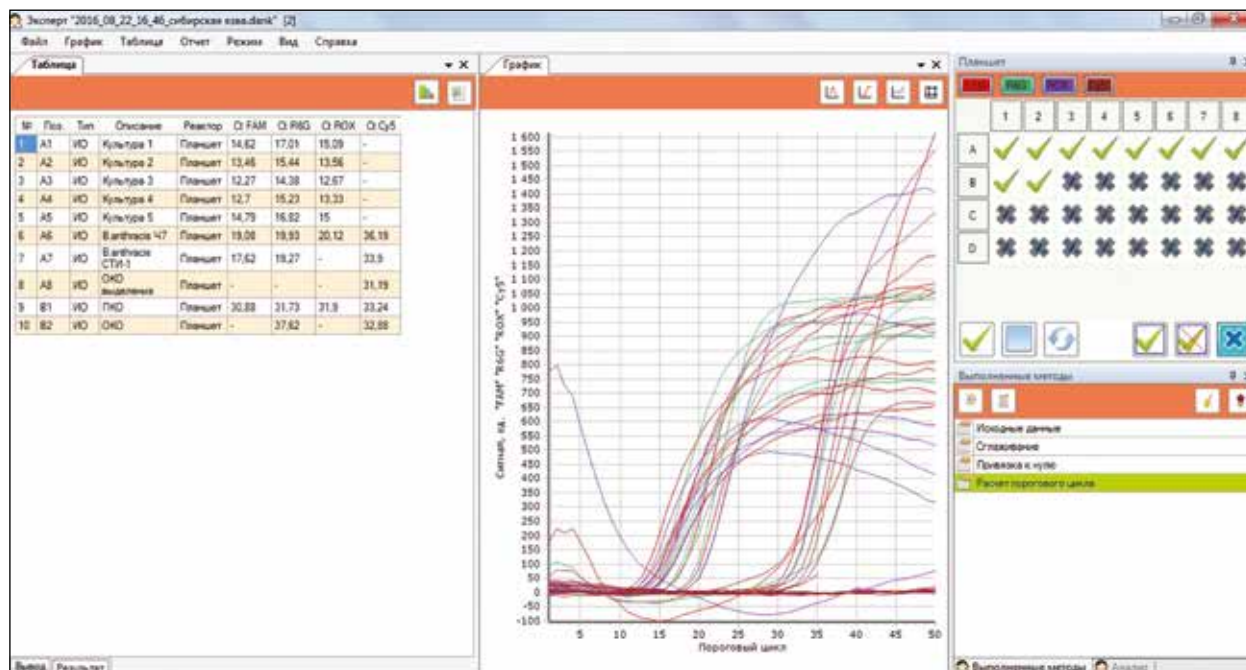


Рисунок 4 — Результаты исследования выделенных микробных культур методом ПЦР-РВ

В мазках, приготовленных из выросших на бикарбонатной среде капсульных колоний с последующей окраской по методу Бурри, просматривались отдельные клетки или короткие цепочки, окруженные бесцветной капсулой. Фотографии препаратов капсульных клеток, окрашенных по методу Бурри, представлены на рисунке 6.

На плотной питательной среде без бикарбоната натрия через 18–20 ч инкубирования наблюдался характерный для сибиреязвенного микроба рост плоских матовых колоний R-формы. В качестве примера на рисунке 7 представлены фотографии роста на плотной питательной среде отдельных колоний выделенных микробных культур.

Для получения спорных культур *B. anthracis* из выросших на плотной питательной среде сибиреязвенных колоний готовили бульонные культуры, которыми засеивали матрасы со средой

для спорообразования. Процесс спорообразования отслеживали ежедневно путем микроскопии мазков, окрашенных по Граму и Цилю–Нильсену. На рисунке 8 представлена микроскопическая картина процесса спорообразования одного из выделенных изолятов на плотной питательной среде на 24–96 ч роста.

Для определения лизабельности выделенных сибиреязвенных культур использовали культуру видоспецифического фага Ф-94, лабораторного приготовления. Исследование показало, что все выделенные сибиреязвенные культуры, как и культура штамма Ч-7, лизировались специфическим сибиреязвенным бактериофагом Ф-94. На рисунке 9 в качестве примера представлены результаты исследования лизабельности двух выделенных микробных культур в сравнении со штаммом Ч-7 *B. anthracis*.

Изучение биохимических свойств (фосфатазная, протеолитическая, гемолитическая и

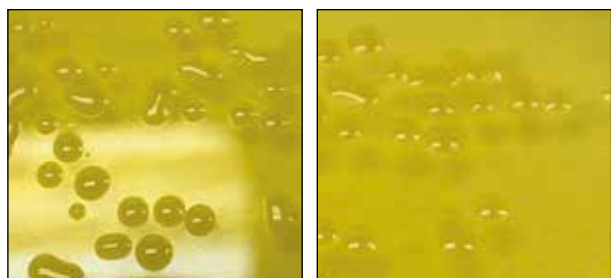


Рисунок 5 — Типичный для выделенных микробных культур *B. anthracis* рост на плотной питательной среде, содержащей бикарбонат натрия

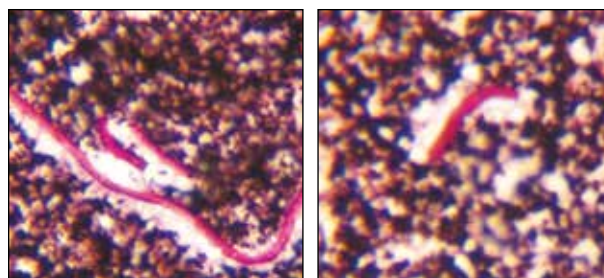


Рисунок 6 — Фотографии капсульных клеток изолятов *B. anthracis*, окрашенных по методу Бурри

лецитиназной активности) исследуемых культур проводили в сравнении с тест-штаммами Ч-7 *B. anthracis* и № 8 *B. cereus*. Полученные результаты свидетельствовали, что по данному спектру биохимических реакций выделенные микробные культуры *B. anthracis* обладают типичными для сибиреязвенного микроба свойствами.

Для оценки чувствительности к пеницилину использовали тест «жемчужное ожерелье». Результаты исследования представлены на рисунке 10.

Исследования показали, что данный тест был положительным для всех выделенных культур. На агаре Хоттингера, содержащем 0,5 и 0,05 мкг/мл бензилпенициллина, просматривались измененные микробные клетки шаровидной формы, расположенные в виде коротких или длинных цепочек. Микробные клетки контрольной культуры *B. cereus* росли в виде цепочек и палочек обычной формы.

Чувствительность выделенных изолятов к другим антибактериальным препаратам определяли методом диффузии в агар (метод дисков). Полученные результаты исследования по некоторым из них представлены в таблице 2.

Из представленных в таблице 2 данных следует, что изученные изоляты высоко чувствительны к средствам общей экстренной профилактики (доксикаину, пефлоксацину и рифампицину), а также основным средствам специальной экстренной профилактики и этиотропного лечения сибирской язвы (ампициллину, ципрофлоксацину, амикацину, гентамицину).

Исследование вирулентности выделенных изолятов проводили в сравнении со штаммом Ч-7 *B. anthracis*. Результаты эксперимента показали, что культуры всех изученных изолятов, как и культура штамма Ч-7, обладают высокой вирулентностью в

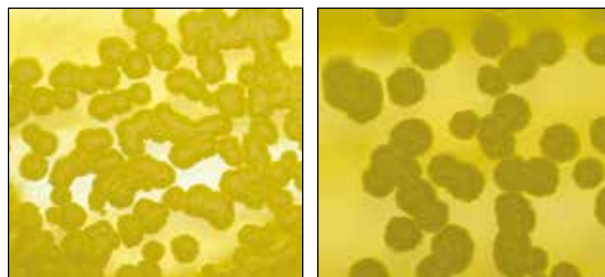


Рисунок 7 — Рост на плотной питательной среде отдельных колоний выделенных микробных культур

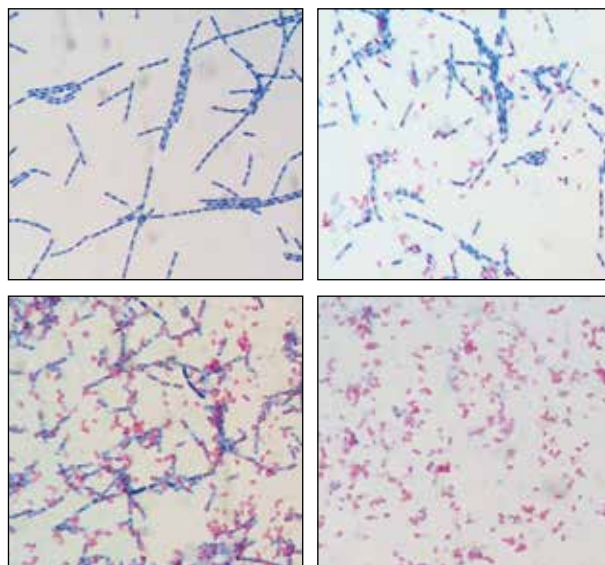


Рисунок 8 — Световая микроскопия окрашенных по Цилю-Нильсену мазков-препаратов одного из изолятов *B. anthracis* на 24–96 ч роста на плотной питательной среде «HiMedia» (Индия)



Рисунок 9 — Результаты исследования лизабельности выделенных сибиреязвенных культур специфичным бактериофагом Ф-94
(а, б — микробные культуры выделенных изолятов *B. anthracis*; в — микробная культура референс-штамма Ч-7 (контроль))

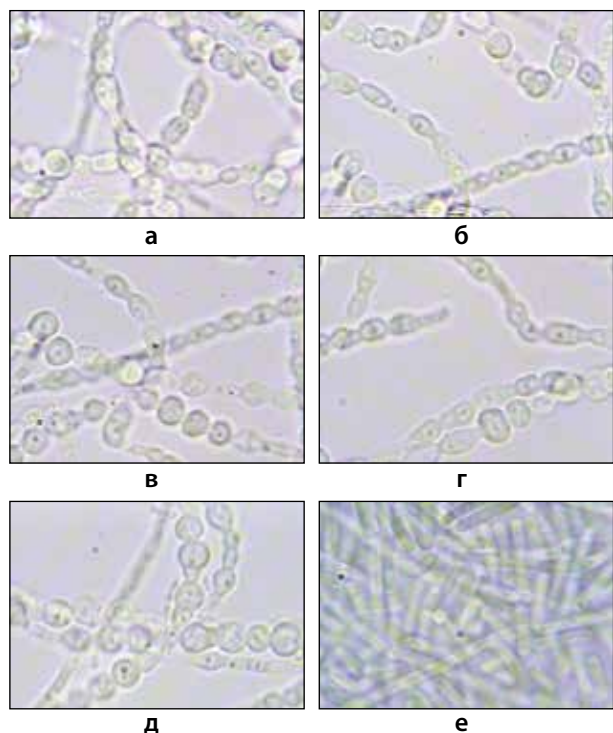


Рисунок 10 — Результаты исследования чувствительности выделенных микробных культур *B. anthracis* в тесте «жемчужное ожерелье» (а–г – исследуемые микробные культуры; д – штамм Ч-7 *B. anthracis*; е – штамм № 8 *B. cereus* (×1350))

отношении белых мышей. Величина LD_{50} составляла от 5 до 7 спор, а средняя продолжительность жизни животных с момента инфицирования до гибели не превышала 3,6 суток.

На заключительном этапе исследований нами было проведено генетическое типирование выделенных микробных культур *B. anthracis* методом мультилокусного VNTR-анализа.

Примеры электрофореграмм продуктов амплификации отдельных VNTR-локусов выделенных изолятов в сравнении со штаммами СТИ-1, Ч-7 и 1051 сибиреязвенного микроба представлены на рисунках 11, 12.

Выявленный генотип сравнивали с ранее полученными результатами генетического типирования штаммов из Государственной коллекции микробных культур филиала 48 ЦНИИ Минобороны России (г. Киров). В результате сравнения было выявлено, что генотипы изолятов по всем исследованным VNTR-локусам совпадают со штаммом *B. anthracis* под номером 1051, выделенным в 1935 г. Уфимской ветлабораторией из трупа лошади. Генетические профили изолятов по некоторым из изученных VNTR-локусам в сравнении со штаммами 1051, СТИ-1 и Ч-7 *B. anthracis* представлены в таблице 3.

Результаты VNTR-типирования позволяют констатировать, что выявленный генотип не является экзотичным для России, подтверждением чему является наличие в Государствен-

Таблица 2 — Чувствительность исследуемых культур *B. anthracis* к антибактериальным препаратам методом дисков

Наименование антибактериального препарата (содержание препарата в диске, мкг)	Чувствительность к антибактериальному препарату микробной культуры изолята (штамма) ...					
	1	2	3	4	5	Ч-7
Амикацин (30)	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
Амоксицилин/клавуланат (10/10)	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
Ампицилин (10)	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
Гентамицин (10)	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
Офлоксацин (5)	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
Пефлоксацин (10)	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
Рифампицин (5)	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
Доксициклин (10)	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
Цефаклор (30)	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
Цефепим (30)	У	У	У	У	У	У
Цефиксим (5)	У	У	У	У	У	У
Цефтриаксон (30)	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
Ципрофлоксацин (5)	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч

Примечания.
1. «Ч» – чувствителен (диаметр зоны задержки роста 15–25 мм и более);
2. «У» – устойчив (диаметр зоны задержки роста менее 10 мм).

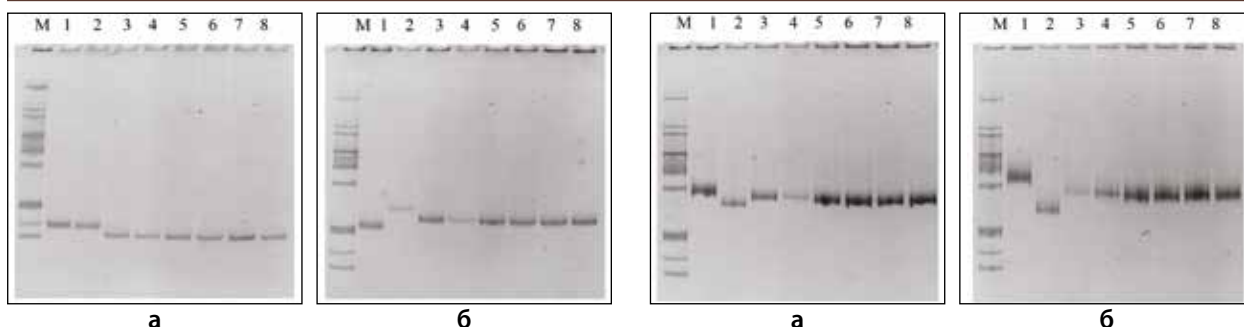


Рисунок 11 — Электрофореграмма фракционирования в 8 % ПААГ продуктов амплификации VNTR-локусов сибирезвенного микроба *Ceb-Bams-3* (а) и *Ceb-Bams-13* (б) (М – молекулярный маркер ДНК GeneRuler™ 100 br DNA LadderPlus; 1–8 – продукты амплификации локусов *Ceb-Bams-3* (а) и *Ceb-Bams-13* (б): 1 – СТИ-1, 2 – Ч-7; 3 – 1051; 4–8 – выделенные из проб микробные культуры *B. anthracis*)

Рисунок 12 — Электрофореграмма фракционирования в 8 % ПААГ продуктов амплификации VNTR-локусов сибирезвенного микроба *Ceb-Bams-22* (а) и *Ceb-Bams-23* (б) (М – молекулярный маркер ДНК GeneRuler™ 100 br DNA LadderPlus; 1–8 – продукты амплификации локусов *Ceb Bams 22* (а) и *Ceb-Bams-23* (б): 1 – СТИ-1, 2 – Ч-7; 3 – 1051; 4–8 – выделенные из проб микробные культуры *B. anthracis*)

ной коллекции микроорганизмов штамма с идентичным VNTR-генотипом.

Выводы

1. Выделенные из проб органов и тканей северных оленей, павших во время эпизоотии сибирской язвы в ЯНАО в июле–августе 2016 года, микробные культуры имеют типичные для высоковирулентных штаммов *B. anthracis* биологические свойства и высоко чувствительны к

основным классам антибактериальных препаратов, в том числе применяемым для профилактики и лечения сибирской язвы.

2. Идентичность VNTR-генотипов микробных культур *B. anthracis*, выделенных из разных проб, подтверждает единственный источник заболевания.

3. Наличие в Государственной коллекции микроорганизмов филиала 48 ЦНИИ Мино-

Таблица 3 — Генетические профили исследуемых изолятов (штаммов) *B. anthracis* по некоторым VNTR-локусам хромосомной локализации из числа описанных Keim et al. [6] и Le Fleche et al. [7]

Наименование VNTR-локуса	Размер продукта амплификации у изолята (штамма) <i>B. anthracis</i>							
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	1051	СТИ-1	Ч-7
Ceb-Bams-1	450	450	450	450	450	450	430	430
Ceb-Bams-3	574	574	574	574	574	574	544	619
Ceb-Bams-13	427	427	427	427	427	427	454	454
Ceb-Bams-22	699	699	699	699	699	699	735	663
Ceb-Bams-23	611	611	611	611	611	611	695	569
Ceb-Bams-30	375	375	375	375	375	375	900	930
VrrA	301	301	301	301	301	301	313	313
VrrB ₁	229	229	229	229	229	229	229	229
VrrB ₂	162	162	162	162	162	162	162	162
VrrC ₁	583	583	583	583	583	583	613	613
VrrC ₂	532	532	532	532	532	532	604	532
CG ₃	158	158	158	158	158	158	153	153

Примечание.
Жирным шрифтом отмечены продукты амплификации VNTR-локусов референс-штаммов СТИ-1 и Ч-7, отличающие их от тактовых у выделенных изолятов и штамма 1051 *B. anthracis*.

бороны России (г. Киров) штамма с аналогичным генотипом, выделенного в 1935 г. Уфимской ветлабораторией от трупа лошади,

свидетельствует о существовании на территории нашей страны (Южного Урала) почвенных очагов *B. anthracis* с данным генотипом.

Информация о конфликте интересов

Авторы заявляют, что исследования проводились при отсутствии любых коммерческих или финансовых отношений, которые могли бы быть истолкованы как потенциальный конфликт интересов.

Сведения о рецензировании

Статья прошла открытое рецензирование двумя рецензентами, специалистами в данной области. Рецензии находятся в редакции журнала.

Список источников

1. Инструкция по применению «Набора реагентов «М-Сорб» для выделения ДНК и РНК из клинических образцов и объектов окружающей среды (на магнитных частицах)». М.: ЗАО «Синтол», 2016. 2 с.
2. Инструкция по применению «Набора реагентов для выявления и идентификации ДНК возбудителя сибирской язвы методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОМ-Скрин-Сибирская язва-РВ)». М.: ЗАО «Синтол», 2014. 26 с.
3. Руководство по эксплуатации. Устройство для обнаружения специфической последовательности нуклеиновых кислот – «АНК»: ТУ 9443-003-04699534-2005. М.: ФГБУН Институт аналитического приборостроения РАН, 2009. 59 с.
4. Лабораторная диагностика и обнаружение

возбудителя сибирской язвы: МУК 4.2.2413-08. М., 2009. 126 с.

5. Инструкция по применению «Набора реагентов для выделения геномной ДНК из биологического материала на колонках «К-Сорб-100». М.: ЗАО «Синтол», 2016. 2 с.
6. Keim P., Prince L.B., Klevitska A.M., et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis* // J. Bacteriol. 2000. V. 182 (10). P. 2928–2936.
7. Le Flèche P., Hauck Y., Onteniente L., et al. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis* // BMC Microbiol. 2001. V. 1 (2). P. 2180–2193.

Об авторах

Филиал федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации. 610000, Российская Федерация, г. Киров, Октябрьский проспект, д. 119

Павлов Даниил Леонидович. Старший техник научно-исследовательского отдела.

Онучина Наталья Викторовна. Младший научный сотрудник научно-исследовательского отдела, канд. биол. наук.

Кузнецовский Андрей Владимирович. Начальник научно-исследовательского управления, канд. биол. наук.

Фоменков Олег Олегович. Начальник научно-исследовательского отдела, канд. биол. наук.

Туманов Александр Сергеевич. Начальник филиала, канд. мед. наук, доцент.

Адрес для переписки: Павлов Даниил Леонидович; DanilPavlov43@mail.ru

The Results of the Research of Biological and Genetic Properties of the Anthrax Strains Isolates during the Epizootic 2016 in Yamal-Nenets Autonomous District

D.L. Pavlov, N.V. Onuchina, A.V. Kuznetsovskiy, O.O. Fomenkov, A.S. Tumanov

Branch Office of the Federal State Budgetary Establishment «48 Central Scientific Research Institute» of the Ministry of Defence of the Russian Federation,
Oktyabrsky Avenue 119, Kirov 610000, Russian Federation

The article is dedicated to the results of the studies of *Bacillus anthracis* isolates, selected during the liquidation of anthrax epizootic in the Yamal-Nenets Autonomous District in summer 2016. The above mentioned isolates turned out to be highly sensitive to the means of general emergency prophylaxis (doxycycline, pefloxacin and rifampicin), as well as to the main means of special emergency prophylaxis and etiotropic therapy of anthrax (ampicillin, ciprofloxacin, amikacin, gentamicin). The studies revealed also the high virulence of *B. anthracis* strain in white mice. The lethal dose (LD₅₀) turned out to be from 5 to 7 spores, and the average lifetime of animals since the moment of contamination till death did not exceed 3,6 days. The results of VNTR typing allowed to state, that the genotype of *B. anthracis* isolates, that caused the anthrax epizootic outbreak in the Yamal, was not exotic for Russia. The Russian National Collection of Microorganisms already possesses the stem with identical VNTR-genotype. The Yamal isolates of *B. anthracis* coincide with the *B. anthracis* strain 1051, obtained in 1935 by the veterinary laboratory in Ufa from the corpse of the horse. It shows the presence of steady hotbeds of *B. anthracis* of the above mentioned genotype in our country's soil in the Southern Urals.

Keywords: *Bacillus anthracis*; epizootic; Yamal-Nenets Autonomous District; strain (isolate); diagnostics.

For citation: Pavlov D.L., Onuchina N.V., Kuznetsovskiy A.V., Fomenkov O.O., Tumanov A.S. The Results of the Research of Biological and Genetic Properties of the Anthrax Strains Isolates during the Epizootic 2016 in Yamal-Nenets Autonomous District // Journal of NBC Protection Corps. 2017. V. 1. № 1. P. 23–32.

Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationship that could be construed as a potential conflict of interest.

Peer review information

The article has been peer reviewed by two experts in the respective field. Peer reviews are available from the Editorial Board.

References

1. Reagent kit «M-Sorb» for DNA and RNA extraction from the clinical and the environmental samples (on magnetic particles). Instruction manual. Moscow: ZAO «Syntol», 2016. 2 p. (in Russian).
2. Kit for the isolation and the identification of the DNA of the causative agent of anthrax by polymerase chain reaction in real time (OM-Screen-Anthrax-PB). Instruction manual. Moscow: ZAO «Syntol», 2016. 26 p. (in Russian).
3. The device for sequence-specific nucleic acid detection – «ANK». Technical instruction 9443-003-04699534-2005. The institute for analytical instrumentation of the Russian Academy of Sciences (IAI RAS). Moscow; 2009. 59 p. (in Russian).
4. Laboratory diagnostics and the detection of the causative agent of anthrax; methodical instructions 4.2.2413-08. Moscow: 2009. 126 p. (in Russian).
5. Reagent kit for genomic DNA extraction from the biological material. Instruction manual. Moscow: ZAO «Syntol», 2016. 2 p. (in Russian).
6. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *B. anthracis* // J. Bacteriol 2000. Vol. 182. P. 2928–2936.
7. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis* // BMC Microbiology. 2001. V. 1 (2). P. 2180–2193.

Authors

Branch Office of the Federal State Budgetary Establishment «48 Central Scientific Research Institute» of the Ministry of Defence of the Russian Federation. Oktyabrsky Avenue 119, Kirov 610000, Russian Federation.

Pavlov D.L. Senior Technical Officer of the Scientific and Research Department.

Onuchina N.V. Junior Researcher of the Scientific and Research Department. Candidate of Biological Sciences.

Kuznetsovskiy A.V. Chief of the Scientific and Research Branch. Candidate of Biological Sciences.

Fomenkov O.O. Chief of the Scientific and Research Department. Candidate of Biological Sciences.

Tumanov A.S. Chief of the Branch. Candidate of Medical Sciences, Associate Professor.

Address: Pavlov Danil Leonidovich; DanilPavlov43@mail.ru