

Результаты мониторинга сибиреязвенных моровых полей эпизоотии 2016 года на территории Ямальского района Ямало-Ненецкого автономного округа

А.В. Савиных¹, Д.Л. Павлов¹, А.В. Кузнецовский¹, О.О. Фоменков¹,
А.С. Туманов¹, А.А. Суслопаров², А.С. Морозов³

¹ Филиал федерального государственного бюджетного учреждения
«48 Центральный научно-исследовательский институт»
Министерства обороны Российской Федерации, 610000,
Российская Федерация, г. Киров, Октябрьский проспект, д. 119

² Научно-исследовательский центр (биологической защиты специального назначения) федерального государственного бюджетного учреждения
«48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны
Российской Федерации, 620048, Российская Федерация,
г. Екатеринбург, улица Звездная, д. 1

³ Филиал федерального государственного бюджетного учреждения
«48 Центральный научно-исследовательский институт»
Министерства обороны Российской Федерации, 620048, Российская Федерация,
г. Екатеринбург, улица Звездная, д. 1

Поступила 08.08.2017 г. Принята к публикации 14.09.2017 г.

В ходе обследования специалистами ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России моровых полей на территории Ямальского района Ямало-Ненецкого автономного округа (ЯНАО) в 2017 г. на предмет контаминации возбудителем сибирской язвы было отобрано 32 пробы. В двух из них, № 3 – зольный остаток с места сжигания трупа оленя, и № 13 – биологический материал от трупа, не подвергнувшегося полному сжиганию, методом ПЦР в режиме реального времени обнаружены специфические фрагменты ДНК *Bacillus anthracis*. Из этих проб были получены чистые культуры возбудителя сибирской язвы. Установлено, что все они обладают типичными для высоковирулентных штаммов *B. anthracis* биологическими свойствами. Величина LD₅₀ в отношении белых мышей составляла 5,8 и 6,2 спор для изолятов № 3 и № 13 соответственно, а средняя продолжительность жизни животных с момента инфицирования до гибели не превышала 3,5 сут. Генетическое типирование выделенных изолятов по 18 VNTR-локусам хромосомной локализации показало, что их генотипы полностью идентичны штамму *B. anthracis* Ямал-1, выделенному сотрудниками филиала ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (г. Киров) из трупа северного оленя в ходе ликвидации последствий эпизоотии сибирской язвы в ЯНАО в 2016 г. Совпадение генетических профилей у выделенных микробных культур и штамма Ямал-1 *B. anthracis* свидетельствует об одном источнике их происхождения и о наличии на территории Ямальского района ЯНАО устойчивых очагов *B. anthracis*, что требует от местных властей постоянной эпизоотической и эпидемической настороженности в отношении сибирской язвы.

Ключевые слова: сибирская язва; *Bacillus anthracis*; генетический профиль; VNTR-локус.

Библиографическое описание: Савиных А.В., Павлов Д.Л., Кузнецовский А.В., Фоменков О.О., Туманов А.С., Суслопаров А.А., Морозов А.С. Результаты мониторинга сибиреязвенных моровых полей эпизоотии 2016 года на территории Ямальского района Ямало-Ненецкого автономного округа // Вестник войск РХБ защиты. 2017. Т. 1. № 3. С. 18–29.

Заболеваемость сибирской язвой в Российской Федерации в последние годы находилась на спорадическом уровне, не превышая 0,2 случаев на 100 тысяч населения (не более 24 случаев) в год [1]. Летом 2016 г. обстановка по данной инфекции резко осложнилась в связи с крупнейшей с 40-х годов прошлого столетия эпизоотией среди северных оленей (*Rangifer tarandus*) в Ямало-Ненецком автономном округе (ЯНАО), повлекшей за собой и эпидемические осложнения. В период с 25 июля по 2 августа в Ямальском районе ЯНАО было зарегистрировано 36 случаев заболевания людей сибирской язвой из числа 97 госпитализированных [2–4].

Эпизоотия сибирской язвы явилась следствием следующих причин. С 2007 г. в связи с высокими материальными затратами на фоне относительного эпизоотологического и эпидемиологического благополучия была прекращена вакцинация против сибирской язвы северных оленей и соответствующих категорий населения. Температурная аномалия в июне-июле 2016 г., когда дневная температура в ЯНАО достигала 29–34 °С, привела к увеличению глубины сезонного таяния многолетней мерзлоты, содержащей многочисленные захоронения ранее павших животных, и способствовала перемещению спор сибирязвенного микроба с межмерзлотными водами из глубинных слоев к поверхности почвы. Увеличение численности кровососущих насекомых, а также негативное воздействие жары на иммунную систему оленей, очевидно, также стали причиной массового заболевания северных оленей¹.

Спустя год после ликвидации вспышки инфекции для уточнения эпидемиологической обстановки по сибирской язве на территории ЯНАО специальной экспедицией Министерства обороны Российской Федерации было проведено обследование моровых полей на предмет контаминации *Bacillus anthracis*².

Цель работы – выделение из проб, отобранных на территориях моровых полей эпизоотии

2016 г. в Ямальском районе ЯНАО, культур возбудителя сибирской язвы, его генетическое типирование по 18 VNTR-локусам хромосомной локализации, а также сравнение генетического профиля со штаммами *B. anthracis* из Государственной коллекции микроорганизмов филиала ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (г. Киров).

Материалы и методы

Все работы на территориях моровых полей в ЯНАО проводились с использованием Комплекса многофункционального мобильного модульного для анализа патогенных биологических материалов (агентов) (МКА ПБА) и поддержки принятия решений оперативных групп Минобороны России, действующих в чрезвычайных ситуациях биологического характера.

Взятие проб сырья животного происхождения и объектов окружающей среды, подозрительных на зараженность (контаминацию) *B. anthracis*, проводили, руководствуясь методическими указаниями МУК 4.2.2413-08 «Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы» [5].

В качестве референс-штаммов использовали микробные культуры из Государственной коллекции микроорганизмов филиала ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (г. Киров). Характеристика использованных штаммов приведена в таблице 1.

Исследования с препаратами ДНК *B. anthracis* проводили в соответствии с требованиями методических указаний МУК 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности» [6].

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 [7].

¹ Экология возбудителя сибирской язвы более сложна, чем считают авторы работы. Могилиники с захороненными животными, павшими от сибирской язвы, и места обнаружения останков погибших во время эпизоотии этой болезни животных, т.е. то, что они относят к «морovým полям» – верхушка айсберга природной очаговости сибирской язвы. В 2012 г. специалистами Школы медицины Университета Виргинии (University of Virginia School of Medicine, Charlottesville, Virginia, США) получены прямые доказательства персистенции и размножения *B. anthracis* в амебах вида *Acanthamoeba castellanii* [Dey R., Hoffman P.S., Glomski I.J. Germination and amplification of anthrax spores by soil-dwelling amoebas // Applied and Environmental Microbiology. 2012. V. 78. № 2. P. 8075–8081]. Первичным резервуаром *B. anthracis* являются одноклеточные организмы, эволюционные предшественники фагоцитирующих клеток позвоночных. Видимо, в пищу оленей споры сибирской язвы попали вместе с ягелем – симбиотической ассоциацией грибов, микроскопических зеленых водорослей и простейших. Такие очаги могут поддерживать *B. anthracis* десятки тысяч лет без необходимости в эпизоотиях среди северных оленей. Но на каких территориях они расположены? Где границы таких природных очагов возбудителя сибирской язвы? На эти вопросы можно ответить, если их сначала поставить, но несомненно то, что работы в этом направлении могут изменить современные представления о природной очаговости сибирской язвы (прим. ред.).

² Результаты исследования биологических и генетических свойств сибирязвенных изолятов эпизоотии 2016 г. в ЯНАО были опубликованы в Вестнике войск РХБ защиты 2017. Т. 1. № 1. С. 23–32.

Таблица 1 — Характеристика штаммов микроорганизмов, использованных в экспериментальных исследованиях

Вид микроорганизма	Наименование штамма	Плазмидный состав	Происхождение или источник получения штамма
<i>Bacillus anthracis</i>	Ч-7	pXO1, pXO2	Штамм селекционирован в 1947 г. путем отбора на агаре с 10 % нормальной лошадиной сывороткой протеолитических колоний штамма Ч-6
<i>Bacillus anthracis</i>	Ямал-1	pXO1, pXO2	Штамм выделен специалистами НИЦ 48 ЦНИИ Минобороны России на территории Ямальского района ЯНАО в августе 2016 г. в ходе ликвидации последствий эпизоотии среди северных оленей
<i>Bacillus cereus</i>	8	-	Штамм дикого типа, получен из Коллекционного центра Ставропольского НИПЧИ 11.04.2003 г.

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 [8].

Подтверждение принадлежности микробных культур к виду *B. anthracis* осуществляли с применением набора реагентов для выявления и идентификации ДНК возбудителя сибирской язвы методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени, «ОМ-Скрин-Сибирская язва-РВ», в детектирующем термоциклере «АНК-32» производства ИАП РАН [9, 10].

Генетическое типирование исследуемых культур проводили методом мультилокусного VNTR-анализа по 18 локусам из числа описанных Keim et al. [11] и Le Fleche et al. [12].

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 ДНК известных штаммов сибиреязвенного микроба после окрашивания геля бромистым этидием (рабочая концентрация раствора 0,5 мкг/мл).

Для постановки биопробы с исходными пробами, поступившими на исследование, а также определения показателя LD_{50} выделенных микробных культур *B. anthracis* использовали беспородных белых мышей обоих полов массой (18 ± 2) г. Определение патогенности выделенных микробных культур проводили с ис-

пользованием золотистых хомячков массой от 120 до 150 г и кроликов массой от 1800 до 2000 г.

Результаты и обсуждение

В ходе обследования моровых полей на территории Ямальского района ЯНАО на предмет контаминации возбудителем сибирской язвы специалистами 48 ЦНИИ Минобороны России были отобраны пробы из объектов окружающей среды и биологического материала (почва, зольный остаток с мест сжигания трупов оленей, трупный материал от оленей, не подвергшихся полному сжиганию). Представлялось целесообразным отобрать для исследования максимально разнообразный материал с нескольких моровых полей.

Все работы по забору, транспортированию и подготовке проб из объектов окружающей среды осуществляли в строгом соответствии с требованиями СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)» [13], а также СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности» [14].

Фотоматериалы отдельных мест отбора проб с обследуемых моровых полей и скотомогильников представлены на рисунке 1.

Пробы почвы с мест сжигания брали на глубине до 15 см. Особое внимание обращали на костные и другие животные остатки, которые также отбирались для исследования. Кусочки кожи размером 3×3 см отбирали с периферических незагнивших и незаплесневевших участков шкурок трупов животных, сохранившихся после сжигания. Шерсть для исследования отбирали из разных мест в количестве не менее 5 образцов массой около 2 г каждый. Пробы воды из водоема рядом с местом сожжения

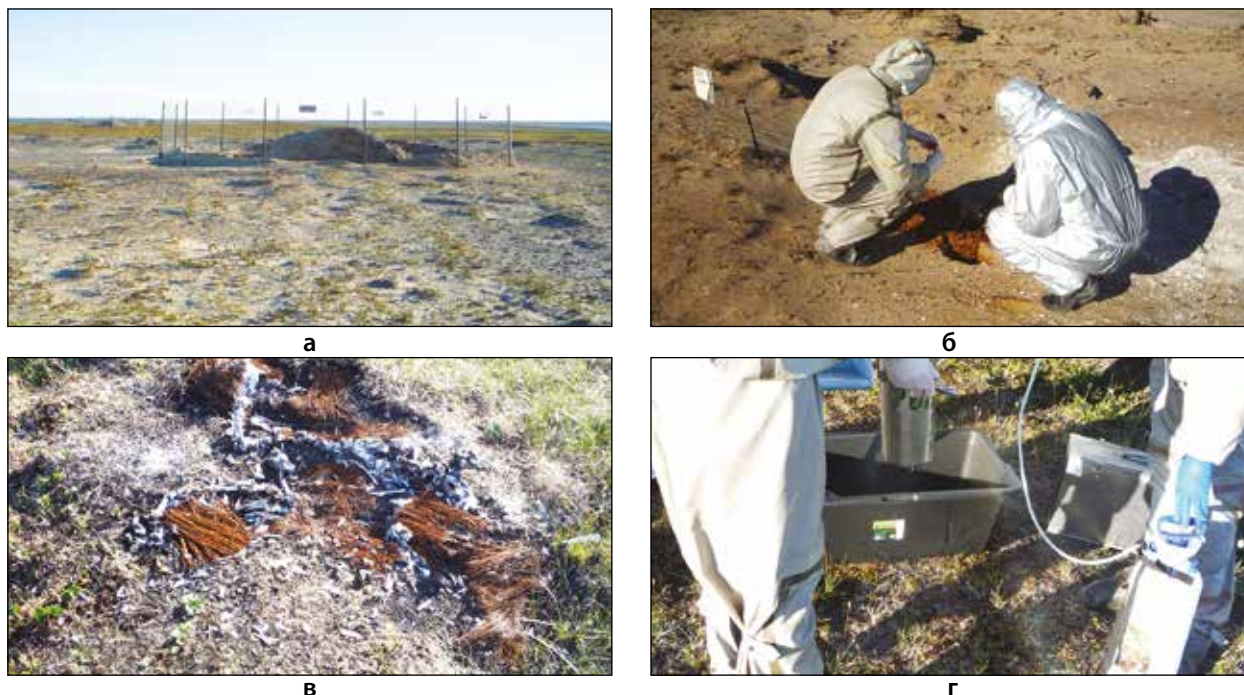


Рисунок 1 — Отдельные места отбора проб с обследуемых моровых полей и скотомогильников (а – общий вид скотомогильников, сформированных в 2016 г.; б – отбор проб почвы; в – место сжигания трупа оленя; г – проведение дезинфекционной обработки после отбора проб)

Таблица 2 — Описание и географические координаты мест отбора проб, доставленных для исследования в НИЦ 48 ЦНИИ Минобороны России

№ пробы	Место отбора (описание) пробы	Географические координаты места отбора пробы
1	Почва с места сжигания	N 68.24.010 E 71.01.200
2	Почва с места захоронения (скотомогильника)	
3	Почва с места сжигания	
4	Почва с места сжигания	
5	Почва с места сжигания	
6	Трупный материал	N 68.24.390 E 70.47.720
7	Почва с места сжигания	
8	Смыв с растительности	
9	Трупный материал	N 68.24.326 E 70.47.696
10	Почва с места сжигания	
11	Почва с места сжигания	
12	Трупный материал (кожа с головы)	N 68.24.989 E 70.44.435
13	Трупный материал (кожа с шерстью с ноги)	
14	Шерсть	
15	Проба растительности	N 68.25.077 E 70.44.857
16	Почва с места сжигания	
17	Трупный материал	N 68.24.517 E 70.74.332
18	Смыв с ребра	
19	Проба почвы из-под трупа	

Продолжение таблицы 2

20	Трупный материал	N 68.24.327 E 70.47.419
21	Смыв с шерсти	
22	Проба почвы	
23	Почва из-под трупа	N 68.24.335 E 70.47.390
24	Проба растительности	
25	Вода с места сжигания	N 68.24.435 E 70.47.390
26	Почва с места сжигания	
27	Трупный материал	N 68.24.643 E 70.47.272
28	Почва с места сжигания	
29	Смыв с ноги	
30	Шерсть	N 68.24.732 E 70.47.440
31	Проба почвы из-под трупа	
32	Смыв с ребра	

животного отбирали у поверхности на глубине до 15 см и у дна общим объемом 1 л. Также были отобраны пробы придонного осадка у береговой кромки, которые в дальнейшем исследова-

ли так же, как пробы почвы. С мест наиболее вероятного обсеменения спорами с помощью стерильного тампона, смоченного стерильной дистиллированной водой, делали смывы. Там-



а



б

Рисунок 2 — Места отбора проб № 3 и 13
(а – отбор пробы № 3 – почва с места сжигания трупа оленя;
б – отбор пробы № 13 – трупный материал (кожа с шерстью с ноги))

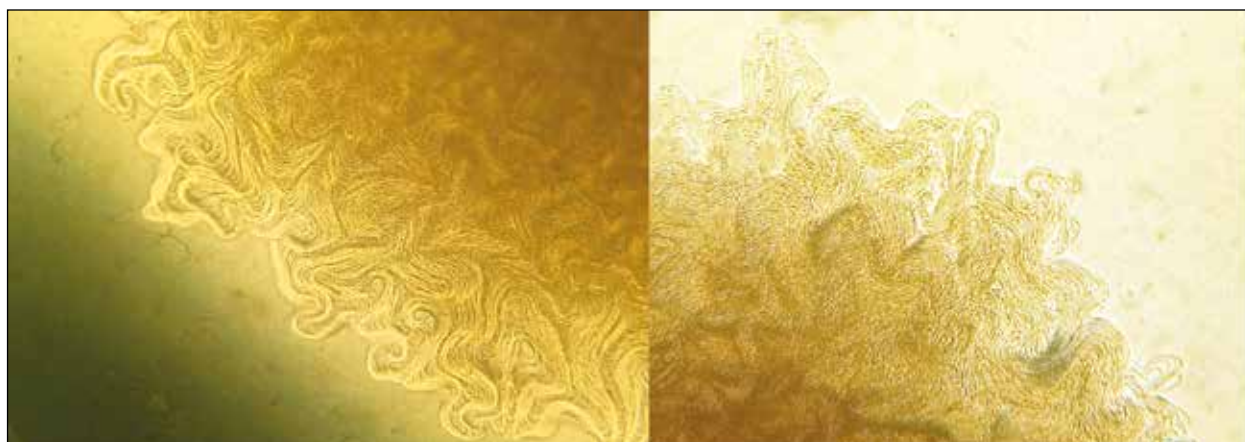


Рисунок 3 — Световая микроскопия периферии отдельных колоний с типичным для возбудителя сибирской язвы характером роста на плотной питательной среде (x300)

поны помещали в пробирки, заливали 15 мл стерильной дистиллированной воды и закрывали пробкой.

Всего было отобрано и доставлено в филиал 48 ЦНИИ Минобороны России (г. Киров) 32 пробы. Описание отобранных проб и географические координаты мест их отбора представлены в таблице 2.

Анализ методом ПЦР в режиме реального времени с использованием Набора реагентов «ОМ-Скрин-Сибирская язва-РВ» [9] подтвердил наличие в двух пробах, обозначенных № 3 и № 13, специфических фрагментов ДНК *B. anthracis*. Проба № 3 представляла собой зольный остаток с места сжигания трупа оленя, проба № 13 – биологический материал от трупа, не подвергнутого полному сжиганию. Места отбора указанных проб представлены на рисунке 2.

Результаты бактериологических исследований положительных в ПЦР проб через 18–20 ч инкубирования также подтвердили наличие в них специфической контаминации, в обоих случаях в высевах на поверхности плотной питательной среды, содержащей полимиксин В,

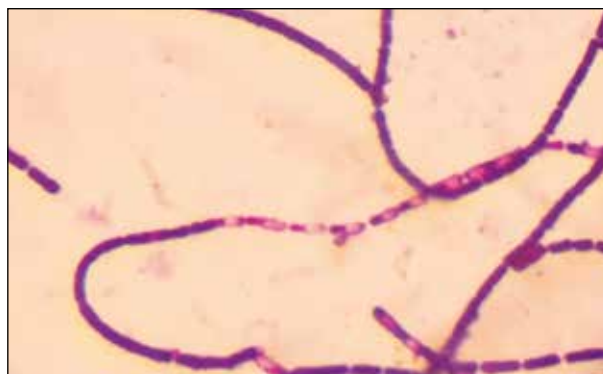
был обнаружен рост колоний, типичных по морфологии для возбудителя сибирской язвы. При просмотре через микроскоп с увеличением в 300 раз данные колонии заметно отличались от других микроорганизмов. Их периферия выделялась неровными краями с отходящими от них волнистыми отростками, напоминающими так называемую «львиную гриву» или «голову медузы», что характерно для *B. anthracis*. Фотографии периферии отдельных колоний на плотной питательной среде с типичным для возбудителя сибирской язвы характером роста представлены на рисунке 3.

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).

В каждом случае чистую культуру выделяли бактериологическим методом еще до подтверждения специфической гибели зараженных лабораторных животных.



а

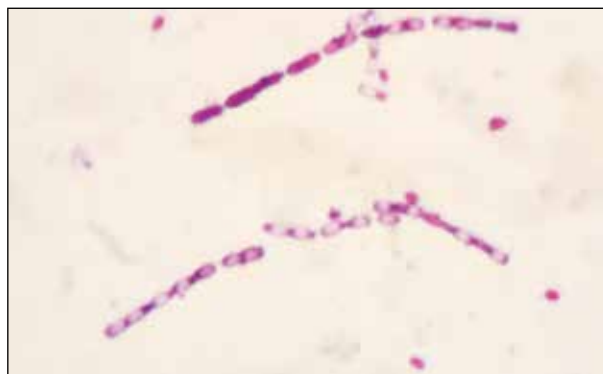


б

Рисунок 4 — Микроскопия мазков, приготовленных микробных культур через 18–20 ч роста (окраска по Граму, $\times 1350$)
(а – агаровая микробная культура; б – бульонная микробная культура)



а



б

Рисунок 5 — Микроскопия мазков, приготовленных из суточных микробных культур (окраска по Цилю–Нильсену, $\times 1350$)
(а – агаровая микробная культура; б – бульонная микробная культура)

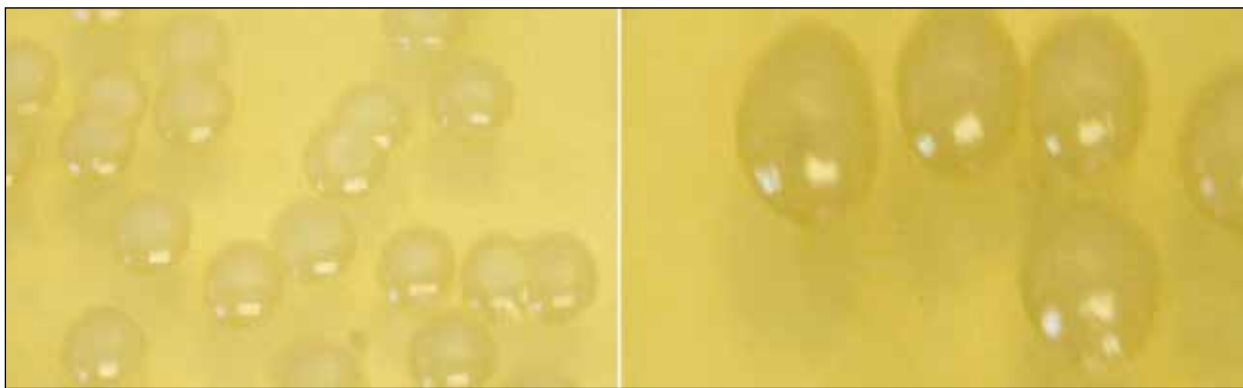


Рисунок 6 — Типичный для выделенных микробных культур *B. anthracis* рост на плотной питательной среде, содержащей бикарбонат натрия

Для изучения морфологии микробных клеток отобранных культур и подтверждения их принадлежности к виду *B. anthracis* делали мазки для микроскопии с последующей окраской по Граму и Цилю–Нильсену. Результаты микроскопии представлены на рисунках 4 и 5.

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 Цилю–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.

Исследование патогенности выделенных культур сибиреязвенного микроба проводили на кроликах. Животных заражали подкожно суспензией микробных клеток каждого штамма в объеме 0,5 мл. В процессе наблюдения за зараженными животными было установлено, что все взятые в опыт кролики погибли на четвертые

сутки 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 референс-штамма Ч-7. В качестве примера на рисунке 6 представлены фотографии роста отдельных колоний S-формы микробных культур *B. anthracis* после пассажа через организм кролика.

На плотной питательной среде без бикарбоната натрия через 18–20 ч инкубирования при температуре $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ наблюдался характерный для сибиреязвенного микроба рост. На чашках росли крупные плоские матовые колонии R-формы.

В качестве примера на рисунке 7 представлена фотография роста на плотной питательной среде отдельных колоний выделенных микробных культур.

Для исследования процесса спорообразования и получения споровых культур *B. anthracis* выросшие колонии каждого изолята в количестве от 10 до 15 штук 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 объеме от 6 до 8 мл засеивали матрасы со средой для спорообразования. Матрасы инкубировали при $(33 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 5 суток. Процесс спорообразования исследовали ежедневно путем микроскопии мазков, окрашенных по Граму и Цилю–Нильсену, в которых



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

Таблица 3 — Вирулентность изолятов *B. anthracis* при подкожном заражении белых мышей

Изолят (штамм) <i>B. anthracis</i>	LD ₅₀ живых спор	τ, сут
3	5,8	3,3
13	6,2	3,5
Ямал-1	6,0	3,4
Ч-7	8,0	3,7

оценивали наличие посторонней микрофлоры и полноту спорообразования. При обнаружении в мазках от 85 до 90 % спор культуры смывали с поверхности агара дистиллированной водой. В полученные споровые суспензии добавляли глицерин до конечной концентрации 30 %. Приготовленные споровые культуры хранили при температуре (4±2) °С и в дальнейшем использовали для оценки LD₅₀.

Для оценки биохимических свойств исследуемых культур использовали методики определения гемолитической, фосфатазной, протеолитической и лецитиназной активностей. По данному спектру биохимических реакций выделенные микробные культуры *B. anthracis* обладали типичными для сибирязвенного микроба свойствами.

Вирулентность полученных изолятов оценивали в опытах на белых мышах. Для заражения лабораторных животных использовали споровые культуры выделенных изолятов, а в качестве контроля – споровые культуры штаммов Ямал-1 и Ч-7 *B. anthracis*. Животных заражали подкожно в расчетных дозах, составляющих 1, 5, 25 и 125 живых спор. За зараженными животными наблюдали в течение 10 суток. Для определения специфичности гибели погибших животных вскрывали и проводили высевы из селезенки (методом «отпечатка») на чашки Петри с бикарбонатной средой. Чашки инкубировали в атмосфере CO₂ при температуре (36±1) °С в течение 24 ч. Животное считали погибшим от сибирской язвы в случае обнаружения на поверхности агара роста, характерного для сибирязвенного микроба. Результаты определения величины LD₅₀ и средней продолжительности жизни животных с момента инфицирования до гибели (τ) представлены в таблице 3.

Из данных, представленных в таблице 3, видно, что культуры обоих изученных изолятов, как и культуры типичных сибирязвенных штаммов Ямал-1 и Ч-7, обладали высокой вирулентностью в отношении белых мышей. Величина LD₅₀ составляла 5,8 и 6,2 спор для изолятов № 3 и № 13 соответственно, а средняя продолжительность жизни животных с момента инфицирования до гибели не превышала 3,5 суток.

Таким образом, все выделенные микробные культуры возбудителя сибирской язвы

обладают типичными для высоковирулентных штаммов *B. anthracis* свойствами.

Мультилокусное VNTR-типирование исследуемых культур проводили по 18 VNTR-локусам хромосомной локализации из числа описанных Keim et al. [11] и Le Fleche et al. [12].

Примеры электрофореграмм продуктов амплификации отдельных VNTR-локусов выделенных изолятов в сравнении со штаммами Ч-7 и Ямал-1 сибирязвенного микроба представлены на рисунках 8–10.

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 генотипических характеристик было выявлено, что генотипы выделенных микробных культур полностью совпадают по всем 18 VNTR-локусам со штаммом Ямал-1 *B. anthracis*, выделенным специалистами филиала 48 ЦНИИ Минобороны России (г. Киров) на территории Ямальского района ЯНАО в августе 2016 г. в ходе ликвидации последствий эпизоотии среди северных оленей. Генетические профили выделенных микробных культур в сравнении со штаммами Ямал-1 и Ч-7 *B. anthracis* представлены в таблице 4.

Результаты генетического типирования позволяют констатировать, что генотипы выделенных изолятов по 18 VNTR-локусам идентичны генотипу штамма Ямал-1 *B. anthracis*.

Таким образом, в ходе проведенных исследований из полученных проб были выделены два изолята возбудителя сибирской язвы. Детальное изучение с помощью бактериологических, микроскопических, биологических и молекулярно-генетических методов подтвердило наличие у них типичных для высоковирулентных штаммов *B. anthracis* свойств. Совпадение генетических профилей у выделенных микробных культур и штамма Ямал-1 *B. anthracis* свидетельствует об одном источнике их происхождения.

По результатам исследований можно сделать вывод о наличии контаминации территории Ямальского района ЯНАО спорами возбудителя сибирской язвы. По причине высокой устойчивости сибирязвенного микроба к воздействию условий окружающей среды, очаг инфекции может сохраняться в течение дли-

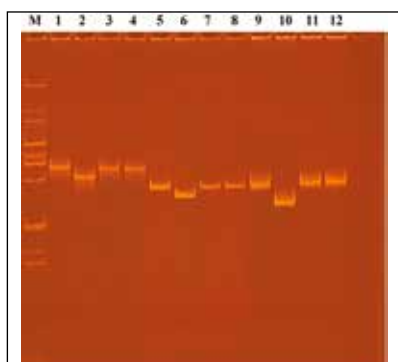


Рисунок 8 — Электрофореграмма фракционирования в 8 % ПААГ продуктов амплификации VNTR-локусов сибиреязвенного микроба *Serratia marcescens*-1, *Serratia marcescens*-22 и *Serratia marcescens*-23 (M – молекулярный маркер ДНК GeneRuler™ 100br DNA Ladder Plus; 1–12 – продукты амплификации локусов *Serratia marcescens*-1 (1–4), *Serratia marcescens*-22 (5–8) и *Serratia marcescens*-23 (9–12): 1, 5, 9 – Ямал-1, 2, 6, 10 – Ч-7; 3, 4, 7, 8, 11, 12 – выделенные из проб микробные культуры *B. anthracis*)

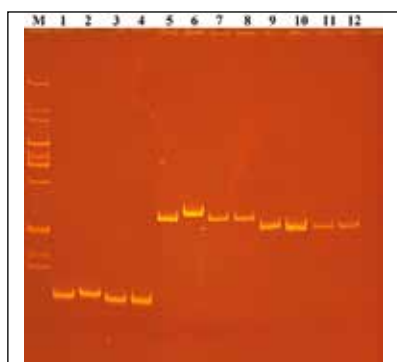


Рисунок 9 — Электрофореграмма фракционирования в 8 % ПААГ продуктов амплификации VNTR-локусов сибиреязвенного микроба *VrrA*, *VrrC1* и *VrrC2* (M – молекулярный маркер ДНК GeneRuler™ 100br DNA Ladder Plus; 1–12 – продукты амплификации локусов *VrrA* (1–4), *VrrC1* (5–8) и *VrrC2* (9–12): 1, 5, 9 – Ямал-1, 2, 6, 10 – Ч-7; 3, 4, 7, 8, 11, 12 – выделенные из проб микробные культуры *B. anthracis*)

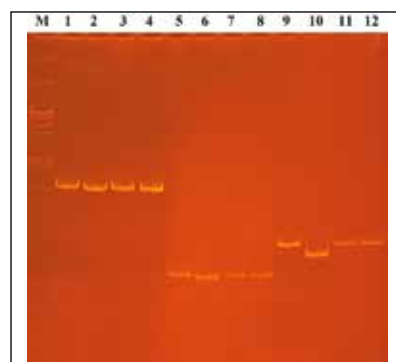


Рисунок 10 — Электрофореграмма фракционирования в 8 % ПААГ продуктов амплификации VNTR-локусов сибиреязвенного микроба *Ceb-Bams 1*, *CG3* и *VrrB1* (M – молекулярный маркер ДНК GeneRuler™ 100br DNA Ladder Plus; 1–12 – продукты амплификации локусов *Ceb-Bams 1* (1–4), *CG3* (5–8) и *VrrB1* (9–12): 1, 5, 9 – Ямал-1, 2, 6, 10 – Ч-7; 3, 4, 7, 8, 11, 12 – выделенные из проб микробные культуры *B. anthracis*)

Таблица 4 — Генетические профили выделенных микробных культур в сравнении со штаммами Ямал-1 и Ч-7 *B. anthracis*

Наименование VNTR-локуса	Размер продукта амплификации у изолята (штамма) <i>B. anthracis</i>			
	№ 3	№ 13	Ямал-1	Ч-7
Ceb-Bams-1	450	450	450	430
Ceb-Bams-3	574	574	574	619
Ceb-Bams-5	385	385	385	385
Ceb-Bams-13	427	427	427	454
Ceb-Bams-15	607	607	607	607
Ceb-Bams-21	676	676	676	676
Ceb-Bams-22	699	699	699	663
Ceb-Bams-23	611	611	611	569
Ceb-Bams-24	630	630	630	630
Ceb-Bams-25	391	391	391	391
Ceb-Bams-28	425	425	425	500
Ceb-Bams-30	375	375	375	930
VrrA	301	301	301	313
VrrB1	229	229	229	229
VrrB2	162	162	162	162
VrrC1	583	583	583	613
VrrC2	532	532	532	532
CG3	158	158	158	153

Примечание.

Жирным шрифтом отмечены продукты амплификации VNTR-локусов референс-штамма Ч-7, отличающие его от таковых у выделенных микробных культур и штамма Ямал-1 *B. anthracis*.

тельного времени. Немаловажным мероприятием для профилактики возникновения новых вспышек инфекции является обязательная

вакцинация всего поголовья северных оленей, выпас которых происходит на зараженной территории, а также местного населения.

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. Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 10 декабря 2014 г. № 81 «Об усилении мероприятий, направленных на профилактику сибирской язвы в Российской Федерации». URL: <http://www.base.garant.ru/70872824/>.
2. Селянинов Ю.О., Егорова И.Ю., Колбасов Д.В., Листищенко А.А. Сибирская язва на Ямале. Причины возникновения и проблемы диагностики // Ветеринария. 2016. № 10. С. 3-7.
3. Шестакова И.В. Сибирская язва ошибок не прощает: оценка информации после вспышки на Ямале летом 2016 г. // Журн. инфектологии. 2016. Т. 8. № 3. С. 5-27.
4. Попова А.Ю., Демина Ю.В., Ежлова Е.Б., Куличенко А.Н. и др. Вспышка сибирской язвы в Ямало-Ненецком автономном округе в 2016 г., эпидемиологические особенности // Пробл. особо опасн. инф. 2016. Вып. 4. С. 42-46.
5. Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы: МУК 4.2.2413-08. М., 2009. 126 с.
6. Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности: МУК 1.3.2569-09. М., 2010. 51 с.
7. 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.

8. Инструкция по применению «Набора реагентов для выделения геномной ДНК из биологического материала на колонках «К-Сорб-100». М.: ЗАО «Синтол», 2016. 2 с.

9. Инструкция по применению «Набор 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.

10. 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.

11. Keim P., Prince L.B., Klevitska A.M. et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *B. anthracis* // J. Bact. 2000. V. 182. P. 2928-2936.

12. Le Fleche P., Hauk Y., Onteniente L. et al. 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.

13. СП 1.3.3118-13. «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)». Санитарные правила. М., 2014. 197 с.

14. СП 1.2.036-95. «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности». Санитарные правила. М., 1995. 81 с.

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.

Савиных Алексей Васильевич. Заместитель начальника научно-исследовательского отдела – начальник группы, канд. биол. наук.

Павлов Данил Леонидович. Старший техник научно-исследовательского отдела.

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.

Научно-исследовательский центр (биологической защиты специального назначения) федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации. 620048, Российская Федерация, г. Екатеринбург, улица Звездная, д. 1.

Суслопаров Алексей Александрович. Заместитель начальника научно-исследовательского центра по научно-исследовательской работе – начальник отдела, канд. мед. наук.

Филиал федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации. 610048, Российская Федерация, г. Екатеринбург, улица Звездная, д. 1.

Морозов Александр Сергеевич. Начальник научно-исследовательского отдела, канд. техн. наук.

Адрес для переписки: Павлов Данил Леонидович; NIC48CNII@mail.ru

The Results of Monitoring of Death Places of Animals, Died from Anthrax during the Epizootic 2016 in Yamal-Nenets Autonomous District

A.V. Savinykh¹, D.L. Pavlov¹, A.V. Kuznetsovskiy¹, O.O. Fomenkov¹,

A.S. Tumanov¹, A.A. Susloparov², A.S. Morozov³

¹ 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

² Scientific Research Center of the Federal State Budgetary Establishment «48 Central Scientific Research Institute» of the Ministry of Defence of the Russian Federation, Zvezdnaya street 1, Yekaterinburg 620048, Russian Federation

³ Branch Office of the Federal State Budgetary Establishment «48 Central Scientific Research Institute» of the Ministry of Defence of the Russian Federation, Zvezdnaya street 1, Yekaterinburg 620048, Russian Federation

The article presents the results of the study of samples taken in 2017 by the specialists from the «48 Central Scientific Research Institute» of the Ministry of Defence of Russia in the course of the survey of deathplaces of animals in the territories of Yamal region of the Yamal-Nenets Autonomous District, contaminated by the *Bacillus anthracis* agent. Thirty two samples have been taken during the survey. Real-time PCR identified specific fragments of *B. anthracis* DNA in two of them – in the ash, taken at the spot of the cremation of the reindeer's corpse and in the biological material from one of the unburned corpses. Pure microbial cultures of *B. anthracis* agent have been obtained from these samples. They all possessed the biological properties, typical for high virulent *B. anthracis* strains. The lethal dose (LD₅₀) for white mice turned out to be 5.8 and 6.2 spores for No 3 and No 13 isolates consequently, and the average lifetime of animals since the moment of contamination till death did not exceed 3.5 days. The genetic typing of the isolated isolates for 18 VNTR-loci of the chromosomal localization showed that their genotypes were identic to the *B. anthracis* strain Yamal-1, obtained by the experts from the branch office of the «48 Central Scientific Research Institute» of the Ministry of Defence of Russia (Kirov) from the corpse of a reindeer during the liquidation of the anthrax epizootic in the Yamal-Nenets Autonomous District in summer 2016. The coincidence of the genetic profiles of the isolated microbial cultures and *B. anthracis* strain Yamal-1 indicated one common source of their origin and the presence of the stable focus of *B. anthracis* at the territory of Yamal District. This fact needs more attention from local authorities and requires concerted attention to the epizootic and epidemiological situation in the region.

Keywords: anthrax; *Bacillus anthracis*; genetic profile; VNTR-locus.

For citation: Savinykh A.V., Pavlov D.L., Kuznetsovskiy A.V., Fomenkov O.O., Tumanov A.S., Susloparov A.A., Morozov A.S. The Results of Monitoring of Deathplaces of Animals, Died from Anthrax during the Epizootic 2016 in Yamal-Nenets Autonomous District // Journal of NBC Protection Corps. 2017. V. 1 № 3. P. 18–29.

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. Decree of the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation of December 10, 2014, № 81 «Strengthening measures on the prevention of anthrax in the Russian Federation» URL: <http://www.base.garant.ru/70872824/> (in Russian).
2. Selyaninov Yu.O., Egorova I.Yu., Kolbasov D.V., Listishenko A.A. Anthrax in Yamal: reemergence causes and diagnostic issues // *Veterinary Medicine*. 2016. № 10. P. 3–7 (in Russian).
3. Shestakova I.V. Anthrax does not forgive mistakes: the information assessment following the Yamal Peninsula outbreak in the summer of 2016 // *Zhurn. infectology*. 2016. V. 8, № 3. P. 5–27 (in Russian).
4. Popova A.Yu., Demina Yu.V., Ezhlova E.B., Kulichenko A.N. et al. Outbreak of anthrax in the Yamalo-Nenets autonomous district in 2016, epidemiological peculiarities // *Probl. especially dangerous. inf.* 2016. Issue. 4. P. 42–46 (in Russian).
5. Laboratory diagnostics and the detection of the causative agent of anthrax; methodical instructions 4.2.2413-08. Moscow, 2009. 126 p. (in Russian).
6. Organization of work of laboratories using methods of amplification of nucleic acids when working with material containing microorganisms of I–IV pathogenicity groups; methodical instructions 1.3.2569-09. Moscow, 2010. 51 p. (in Russian).
7. Reagent kit «M-Sorb» for DNA and RNA extraction from clinical and environmental samples (on magnetic particles). Instructions manual. Moscow: ZAO «Syntol», 2016. 2 p. (in Russian).
8. Instructions for use «A set of reagents for isolating genomic DNA from biological material on «K-Sorb-100» columns». Moscow: ZAO «Sintol», 2016. 2 p. (in Russian).
9. 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-RV)». Instructions manual. Moscow: ZAO «Sintol», 2014. 26 p. (in Russian).
10. The device for sequence-specific nucleic acid detecting – «ANK»: Technical instruction 9443-003-04699534-2005. The institute for analytical instrumentation of the Russian Academy of Science. Moscow; 2009. 59 p. (in Russian).
11. 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. P. 2928–2936.
12. Le Fleche P., Hauk Y., Onteniente L. et al. 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.
13. Safety of work with microorganisms I-II pathogenicity groups (hazard). Sanitary rules. SP 1.3.3118-13. Moscow, 2014. 195 p. (in Russian).
14. The order of registration, storage, transfer and transportation of microorganisms of I–IV pathogenicity groups. Sanitary rules. SP 1.2.036-95. Moscow, 1995. 81 p. (in Russian).

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.

Savinykh A.V. Deputy Chief of the Scientific and Research Department. Candidate of Biological Sciences.

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

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.

Scientific Research Center of the Federal State Budgetary Establishment «48 Central Scientific Research Institute» of the Ministry of Defence of the Russian Federation. Zvezdnaya street 1, Yekaterinburg 620048, Russian Federation.

Susloparov A.A. Deputy Chief of the Research Center – Chief of the Department. Candidate of Medical Sciences.

Branch Office of the Federal State Budgetary Establishment «48 Central Scientific Research Institute» of the Ministry of Defence of the Russian Federation. Zvezdnaya street 1, Yekaterinburg 620048, Russian Federation.

Morozov A.S. Chief of the Scientific and Research Department. Candidate of Technical Sciences.

Address: Pavlov Danil Leonidovich; NIC48CNII@mail.ru