

**ANALYSIS OF THE GENETIC HOMOGENEITY OF
Bacillus anthracis VACCINE STRAINS STI-1 AND *B. anthracis* 55-VNIIVViM
BY MLVA-25**

Kairzhanova A.D.¹, Karibaev T.B.², Shvedyuk V.B.¹, Tyulegenov S.B.²,
Zharova M.K.², Shevtsova E.S.¹, Kuibagarov M.A.¹, Shevtsov A.B.¹

¹National Center for Biotechnology
13/5, Korgalzhyn road, Astana, 010000, Kazakhstan

²National Reference Center for Veterinary Medicine
22/3, 150 let Abaya str., Astana, 010000, Kazakhstan
ncbshevtsov@gmail.com

ABSTRACT

Determining the genetic stability of the causative agent of anthrax requires analysis of highly variable regions of DNA, including tandem repeats. Analysis of 25 loci with tandem repeats (MLVA-25) is a highly discriminating method used to genotype field strains of *Bacillus anthracis*, and allows the geographical distribution of genotypes to be tracked. This method can be easily applied to control the genetic stability of vaccine strains and strain identification. However, to date, there is no data about the genotypes of MLVA-25 vaccine strains used for vaccination in countries of the Commonwealth of Independent States. Here, using MLVA-25, we genotyped vaccine strains of *B. anthracis* STI-1 and *B. anthracis* 55-VNIIVViM that were deposited by three individuals from Kazakhstan. MLVA profiles of the individual vaccine strains obtained were identical, irrespective of the source. *B. anthracis* STI-1 and *B. anthracis* 55-VNIIVViM differed only in a single tandem repeat at the pXO1aat locus. Comparison of MLVA profiles obtained in this study with those obtained by *in silico* analysis of whole genome data revealed a discrepancy at the Bam22 and Bam23 loci in both *B. anthracis* STI-1 and *B. anthracis* 55-VNIIVViM, and at the Bam5 and Bam24 loci of *B. anthracis* STI-1. This study shows that MLVA analysis is highly discriminatory and can be used for quality control analysis of vaccine preparations. Moreover, standardization of the procedure for commercial application would require the analysis of typical crops.

Keywords: *Bacillus anthracis*, MLVA typing, VNTR alleles, vaccine strains, anthrax.

УДК575.22:577.29

**АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ОДНОРОДНОСТИ ВАКЦИННЫХ
ШТАММОВ *BACILLUS ANTHRACIS* СТИ-1 И *B. ANTHRACIS* 55
ВНИИВВИМ МЕТОДОМ MLVA- 25**

¹Каиржанова А.Д.,¹Карибаев Т.Б.,²Шведюк В.Б.,¹Тюлегенов С.Б.,²Жарова М.К.,²
Шевцова Е.С.,¹Куйбагаров М.А.,¹Шевцов А.Б.¹

¹Национальный центр биотехнологии
Кургальжинское шоссе, 13/5, Астана, 010000, Казахстан

²Национальный референтный центр по ветеринарии
ул. 150 лет Абая, дом 22/3, Астана, 010000, Казахстан
ncbshevtsov@gmail.com

АБСТРАКТ

Высокая генетическая стабильность генома возбудителя сибирской язвы требует использование протоколов на высоковариабельных участках ДНК. Тандемные повторы относятся к гипервариабельной ДНК. Анализ 25 локусов с тандемными повторами (MLVA-25) зарекомендовал себя как высоко дискриминационный метод генотипирования полевых штаммов *Bacillus anthracis*, позволяя отслеживать географическое распределение генотипов. Метод может быть легко интерполирован в контроль генетической стабильности вакцинных штаммов и штаммовой идентификации. Однако до настоящего времени нет данных по генотипам MLVA-25 вакцинных штаммов, используемых для вакцинации в странах СНГ. В данной статье представлены результаты генотипирования вакцинных штаммов *Bacillus anthracis* СТИ-1 и *B. anthracis* 55 ВНИИВВИМ, депонированные тремя депозиторами Казахстана с использованием MLVA-25. MLVA профили вакцинных штаммов

трех различных депозиторов были идентичны между собой. *Bacillus anthracis* СТИ-1 и *B. anthracis* 55 ВНИИВВиМ различались между собой только в локусе рХО1aat на 1 тандемный повтор. Сравнение MLVA профилей *Bacillus anthracis* СТИ-1 и *B. anthracis* 55 ВНИИВВиМ, полученных в данном исследовании с MLVA профилями, полученных методом *in silico* на основании полногеномных данных, выявили несоответствие значений в локусах *Vam22*, *Vam23*, кроме того локусы *Vam5* и *Vam24* у *Bacillus anthracis* СТИ-1. Исследование показало, что MLVA анализ является высокодискриминационным методом и может быть использован в контроле качества вакцинных препаратов. Для стандартизации процедуры требуется анализ типовых культур.

Ключевые слова: *Bacillus anthracis*, MLVA типирование, VNTR аллели, вакцинные штаммы, сибирская язва.

ВВЕДЕНИЕ

Bacillus anthracis – грамположительная, спорообразующая бактерия, является возбудителем зоонозного заболевания – сибирская язва, которая эндемична во всем мире, за исключением Антарктиды. Сибирской язвой преимущественно болеют травоядные домашние животные, в основном поражается крупный и мелкий рогатый скот [1], заболевание остальных видов животных регистрируется реже. Хладнокровные амфибии и рептилии после искусственного поднятия температуры могут быть экспериментально заражены [2]. Случаи заражения людей не часты и обычно обусловлены контактами с зараженными животными или продукцией животноводства. В зависимости от пути заражения различают: легочную или ингаляционную, желудочно-кишечную и кожную формы. Отсутствие соответствующей терапии может привести к гибели, особенно при легочных формах заболевания. Главная особенность возбудителя сибирской язвы – спорообразование, споры могут выживать на открытом воздухе в течение десятилетий, что повышает их жизнеспособность и патогенность. Выживаемость спор и возможность их аэрозольирования теоретически долгое время ставили *Bacillus anthracis* в верху рейтинга патогенов, имеющих потенциал использования в бактериологическом оружии. Беспрецедентные биотеррористические атаки подтвердили реальность теоретических предположений и катастрофичность биотерроризма для человечества [3].

Первые исследования сибирской язвы принадлежат Роберту Коху, который в 1876 году впервые доказал бактериальное происхождение заболевания, выделив чистую культуру *Bacillus anthracis*. Выделение чистой культуры спровоцировало работы по созданию вакцин на основе аттенуации патогенных штаммов, которая основана на потере плазмид или на мутациях в самом геноме бациллы. Геном *Bacillus anthracis* представлен циркулярной хромосомой молекулярной массой около 5,23 млн.п.н. и двух плазмид рХО1 и рХО2 с молекулярной массой 181,6 тысяч п.н. 96,2 тысяч п.н. соответственно. Плазмида рХО1 кодирует трехсторонний сибиреязвенный токсин, состоящий из защитного антигена, летального фактора и фактора отека, тогда как плазмида рХО2 содержит гены, вовлеченные в капсулообразование [4].

В 1881 году Луи Пастер создал первые в мире противосибиреязвенные вакцины путем аттенуации изначально вирулентного штамма, получившие название I и II вакцины Пастера, которые имели различную степень ослабления. Опыт использования показал, что вакцины Пастера имеют высокую реактогенность и смертность привитых животных, превышающую 3%. Впоследствии разные ученые предпринимали попытки дальнейшей аттенуации возбудителя и получения новых, более эффективных и менее опасных вакцин. Так были получены вакцины Ценковского в 1883 году с генотипом (рХО1+/рХО2+), вакцины Ланге в 1891 году, которые долгое время применялись на территории Российской империи и, впоследствии, СССР. Для них характерно снижение реактогенности в сравнении с вакцинами Пастера. Также описаны живые вакцины, которые имеют обе плазмиды, но могут быть ослаблены хромосомными мутациями, некоторые штаммы Пастера, итальянский Карбосап-вакцинный штамм [5], аргентинский штамм А [6].

Большинство живых вакцин против сибирской язвы для животных, рекомендованных МЭБ, используемые во всем мире, в настоящее время основаны на бескапсульном иммуногенном штамме 34F2 *B. anthracis* (рХО1+/рХО2-), полученном из вирулентного бычьего изолята в 1937 году в США, имеющем высокую иммуногенность и безвредность.

В Советском Союзе первый бескапсульный штамм был выделен в 1940 году методом аттенуации вирулентного штамма «Красная Нива», изолированного от лошади. Данный штамм имеет аналогичный генотип со штаммом 34F2 (рХО1+/рХО2-). Для массовой вакцинации животных штамм начали применять с 1942 года и использовали на протяжении более 40 лет. Со временем было установлено снижение иммуногенности данного штамма, при которой возникла необходимость ежегодно двукратно вакцинировать животных, что, возможно, было связано с диссоциацией штамма СТИ. В 1983-1986 гг. во ВНИИВВиМ была создана и апробирована

вакцина на основе штамма *B. anthracis* №55, представляющая собой природно-ослабленный бескапсульный штамм, который однороден и обладает сниженной, в сравнении со штаммом *B. anthracis* СТИ-1, реактогенностью, но при этом создает стойкий иммунитет на 18 месяцев [7]. Вакцины на основе штамма *B. anthracis* №55 и в настоящее время используются для поголовной вакцинации животных на всей территории Российской Федерации и ряда стран СНГ.

Вакцинации людей проводят в редких случаях и рассматривают ее в качестве средства индивидуальных защиты. Существует два основных типа вакцин против сибирской язвы для человека, рекомендованных ВОЗ (Всемирной Организацией Здравоохранения). Это – AVA (Anthrax Vaccine Adsorbed) и AVP (Anthrax Vaccine Precipitated). AVA (адсорбированная вакцина против сибирской язвы) торговое название BioThrax – это единственная лицензированная FDA вакцина против сибирской язвы человека в Соединенных Штатах. AVA классифицируется как субъединичная вакцина, которая не содержит цельных или живых клеток сибирской язвы. Антигенные (иммунологически активные) порции получают из культуральных фильтров токсигенного, но авирулентного, некапсулированного мутанта, известного как V770-NP1-R штамма Vollum *B. anthracis*. Существует также аналогичная британская вакцина против сибирской язвы (известная как AVP). В AVA отсутствует капсульная плазмида pXO2 (требующая для полной вирулентности) и состоит главным образом из протективного антигена (PA) [8] с небольшим количеством эдемотогенного фактора (EF) и летального фактора (LF), количество которых может варьировать от партии к партии. Также присутствуют другие, нехарактеризованные бактериальные побочные продукты. AVA имеет меньшее количество EF и LF, чем AVP. Данные виды вакцин не одобрены для широкого использования, поскольку они никогда не были всесторонне проверены в ходе испытаний на людях. Вакцину применяют людям, которые, вероятно, контактируют с сибирской язвой в связи с их родом деятельности, например, работники кожевенного завода или военнослужащие. Однако в Советском Союзе и в Китае для вакцинации людей использовали живые вакцины. В бывшем СССР использовали вакцину на основе штамма *B. anthracis* СТИ-1, коэффициент эффективности которой составил 75-84,2%, среди населения юга Европы и Среднеазиатских республик [9].

Качество вакцинных препаратов – основа эпидемиологического и эпизоотологического благополучия страны. По информации МИА «Казинформ» со ссылкой на первого вице-министра сельского хозяйства Кайрата Айтуганова, причиной вспышек сибирской язвы в Казахстане в 2016 году было низкое качество использованных вакцин [10]. В этой связи, применение многокомпонентного подхода в контроле вакцинных препаратов может минимизировать риск недоброкачественных партий, а оценка генетической стабильности использованных при производстве штаммов, является одним из важнейших элементов, гарантирующих качество препаратов.

Основными характеристиками безопасности вакцин являются: полная инактивация токсинов, отсутствие остаточной вирулентности (или реверсии вирулентности), отсутствие контаминации, генетическая стабильность и генетическая гомогенность. Наибольшей дискриминационной способностью и воспроизводимостью в отношении *B. anthracis* обладают методы, основанные на анализе ДНК. ДНК анализ успешно применяется в изучении разнообразия изолятов *B. anthracis*, циркулирующих в различных географических регионах. Метод позволяет отследить место происхождения штаммов и дифференцировать естественные и искусственно созданные вспышки [11]. Мультилокусный анализ числа переменных тандемных повторов (MLVA, multiple locus variable-number tandem repeats analysis) является основным методом генетической дактилоскопии *B. anthracis* [12]. MLVA типирование основано на амплификации региона с изменяемым количеством тандемных повторов и определением их количества методом электрофореза. В зависимости от длины повтора возможно использовать агарозный, полиакриламидный гели или разделять фрагменты в капиллярном электрофорезе. Изначально, Keim и др. [13] предложили протокол для молекулярной типизации штаммов *B. anthracis*, основанный на анализе 8 VNTR (варьирующие по числу тандемные повторы) локусов (MLVA-8), которые были идентифицированы путем ДНК секвенирования переменных фрагментов генома (CG3, vtrB1, vtrB2, vtrC1 и vtrC2), вирулентных плазмид (pXO2-at и pXO1-aat) и ранее описанного переменного локуса vtrA [14]. Методом MLVA8 было генотипировано 426 штаммов *B. anthracis*, которые классифицировали их на две основные линии (А и В), включающие 89 различных генотипов. Дискриминационная способность предложенного протокола была ограничена, например, большинство французских и итальянских штаммов были присвоены MLVA-8 генотипы (GT) 1 и 3, которые отличались только одним маркером. По этой причине было увеличено количество маркеров и создана панель MLVA15 [15] [16]. Панель MLVA15 увеличила количество уникальных MLVA генотипов *B. anthracis* 89 до 221.

LeFlèche и др. [17] расширили анализ MLVA8, добавив 14 дополнительных маркеров (Vams1, 3, 5, 7, 13, 15, 21, 22, 23, 24, 25, 28, 30, 31), что значительно улучшило разрешающую способность анализа. Разделение ДНК фрагментов проводили на стандартных агарозных гелях, что снижало себестоимость, но усложняло интерпретацию результатов.

FlorigioLista и др. предложили более усовершенствованный, быстрый и точный метод генотипирования *B. anthracis* с применением капиллярного гель-электрофореза [18]. Преимущество данного метода заключается в высокой точности, особенно при анализе коротких повторов. Предложенная система MLVA включает в себя 25 VNTR маркеров, что увеличило дискриминационную способность по сравнению с ранее описанными протоколами. Капиллярное разделение увеличило воспроизводимость результатов, а возможность мультиплексирования упростило процедуру генотипирования. Создание баз данных MLVA профилей различных патогенов позволяет проводить глобальный мониторинг [19]. Метод MLVA типирования также использовался и при изучении генетической стабильности вакцинных штаммов. Например, исследование 36 вакцинных штаммов *B. melitensis* Rev 1, проведенные D. Garcia-Yoldi с соавт., позволили выявить отличия в 4 локусах, при этом изменения в MLVA профилях коррелировали с изменениями в биологических качествах вакцин – образование крупных колоний, что недопустимо при изготовлении вакцин [20]. MLVA анализ зарекомендовал себя в качестве надежного теста оценки генетической стабильности и достоверности происхождения вакцинных штаммов *B. abortus* 19 и *B. abortus* RB51 [21]. Высокая дискриминационная способность MLVA метода и генетическая стабильность генома *Bacillus anthracis*, позволяет использовать MLVA в генетической оценке и подтверждении происхождения штаммов сибиреязвенных вакцин. На данный момент в международных базах отсутствует информация по MLVA профилю вакцинных штаммов, используемых в странах СНГ. Поэтому целью данного исследования являлось проведение генотипирования методом MLVA с использованием 25 VNTR локусов вакцинных штаммов, используемых для вакцинации в странах СНГ и депонированных в РГП на ПХВ "Национальный референтный центр по ветеринарии" КВКиН МСХ РК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 7 культур: 3 культуры вакцинного штамма *Bacillus anthracis* СТИ-1, трех различных депозиторов; 3 культуры вакцинного штамма *Bacillus anthracis* 55 ВНИИВВиМ трех различных депозиторов и один вирулентный штамм *B. anthracis* 280/6-15-В, выделенный в Жамбылской области в 2015 году от мелкого рогатого скота.

Выделение ДНК

Выделение ДНК проводили с применением набора Qiagen QIAamp DNA MiniKit, согласно инструкции производителя. Учитывая высокую патогенность *B. anthracis* выделение ДНК было проведено в лаборатории РГП на ПХВ «Национальный референтный центр по ветеринарии» КВКиН МСХ РК имеющий разрешение на работу с возбудителями инфекционных заболеваний 2-4 групп патогенности.

Образцы ДНК проводили через 0,22 мкм фильтры для удаления из раствора живых спор *B. anthracis*. Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрическим методом с использованием фотометра NanoDrop.

Идентификация ПЦР

Для видовой идентификации *Bacillus anthracis* были использованы праймеры, предложенные ранее Ramisse V. с соавт. [22]. Использовались праймеры для амплификации вирулентных генов *rag*, локализованных на плазмиде pX01, *cap* на плазмиде pX02 и *Va813* (ген домашнего хозяйства *proV*) в мультиплексной ПЦР. Состав реакционной смеси в 25 мкл: смесь праймеров по 15 пмоль каждого за исключением праймеров *Va813* – 25 пмоль; ДНК бнг; 0,25 мМ каждого дНТФ; 1-х ПЦР буфер 10X *Taq* буфер с KCl (Fermentas, 100 мМ Tris-HCl (pH 8.8 при 25°C) • 500 мМ KCl • 0.8% (v/v) Nonidet P40), ионы магния 2,5 мМ; 5 нМ тетраметиламмония хлорида; 7% сахарозы; ксиленианол 10 мг/мл; бетаин – до финальной концентрации 0,2 М; 2 единицы *Taq* ДНК полимеразы (Fermentas). Программа ПЦР амплификации включала: длительную денатурацию 95°C в течение 3 минут; 30 циклов, 94°C – 30 секунд, 58°C – 45 секунд, 72°C – 45 секунд; финальная элонгация 72°C – 5 минут.

MLVA типирование

Для молекулярного типирования вакцинных штаммов *B. anthracis* был использован мультилокусный анализ числа вариабельных tandemных повторов (MLVA), включающий в себя 25 локусов, предложенных FlorigioLista (2006) [18]. Для амплификации целевых фрагментов использовано 4 мультиплексных ПЦР реакции. Концентрация праймеров реакции соответствовала рекомендациям Lista. Смесь включала: 0,2 мМ каждого дНТФ; 1-х ПЦР буфер (20 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01% (v/v) Tween 20 (Fermentas)), ионы магния 2,5 мМ, DMSO – 1 мкл, смесь *Taq* ДНК полимеразы и *Pfu* ДНК полимеразы в соотношении 1:8 (Fermentas). Программа ПЦР амплификации включала: 96°C в течение 3 минут; 35 циклов 95°C – 20 секунд, 60°C – 30 секунд, 65°C – 2 минуты; финальная элонгация 65°C – 20 минут. После амплификации образцы разводили

в 70 раз и 1,5 мкл использовали для капиллярного разделения на автоматическом генетическом анализаторе ABI3730xl (AppliedBiosystems, Tokyo, Japan), с POP 7 и размерным стандартом LIZ 1200. Анализ размеров VNTR повторов проводили с использованием программного обеспечения GeneMapper 4.1 (AppliedBiosystems).

Верификация размеров методом прямого секвенирования

Для амплификации 16 локусов и прямого секвенирования использовали ту же последовательность праймеров, что и для фрагментного анализа. Для 6 локусов, размер которых был менее 300 п.н., был проведен подбор новых праймеров (таблица 1).

Таблица 1. Нуклеотидная последовательность праймеров для верификации размеров

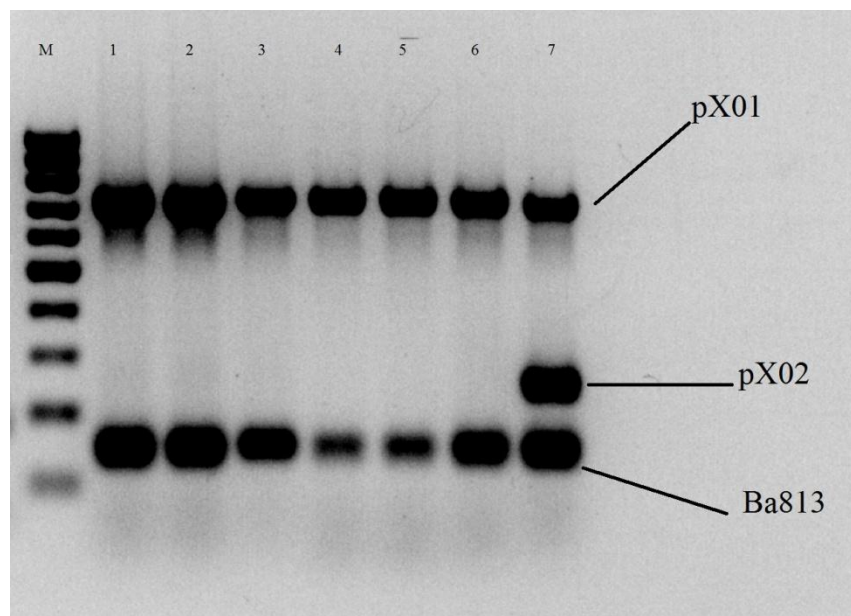
Table 1. Nucleotide sequence of primers for size verification

| Название праймера | Последовательность праймера 5'-3' |
|-------------------|--|
| Primer name | PrimerSequence5'-3' |
| CG3-seq_F | 5'-CTAAAAGACTATAGTACATTTGAT-3' |
| CG3-seq_R | 5'-TATTTCTTGACTTAATGCCAAT-3' |
| vrrB1-seq_F | 5'-CTGCTGCTCCACTAATACTA-3' |
| vrrB1-seq_R | 5'-AGGGTTTTCAACATCAGTA-3' |
| pX01-seq-F | 5'-AAATATACAGCCACTTGATAG-3' |
| pX01-seq-R | 5'-ACATGCTGTGGATGATTAT-3' |
| pX02-seq-F | 5'-CATAAATCTGTCGCCAGTTA-3' |
| vrrB2-seq_R | 5'-CCACAACCTTCGTGCTGAAATC-3' |
| vrrB2_F | 5'-CACAGGCTATTCTTTATCAAACATCATC-3' (Lista F et al 2006) |

Реакцию секвенирования проводили с применением BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (AppliedBiosystems), согласно инструкции производителя, с последующим разделением фрагментов на автоматическом генетическом анализаторе 3730xl DNA Analyzer (AppliedBiosystems). Нуклеотидные последовательности были анализированы и объединены в общую последовательность в программном обеспечении SeqMan (DNAStar).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация вакцинных штаммов проводилась мультиплексной ПЦР, результаты представлены на рисунке 1. Анализ позволяет получить предварительную информацию о вирулентности, поскольку отсутствие любой плазмиды снижает патогенность штаммов *B. anthracis*[23]. У всех 6-ти вакцинных штаммов амплифицировались два гена, ген *pag* плазмиды pXO1 и хромосомный локус *Ba813*, ген *cap* на капсульной плазмиде pXO2 не амплифицировался, что соответствует характеристикам штаммов. Плазмиды вирулентности pXO1 содержит гены, кодирующие компоненты токсина сибирской язвы: *pag* (протективный антиген, PA), *lef* (летальный фактор, LF) и *суа* (фактор отечности, EF). Эти факторы содержатся в островке патогенности 44,8 кб (PAI). Летальный токсин представляет собой комбинацию PA с LF, а фактор отечности представляет собой комбинацию PA с EF[24]. У вирулентного штамма *B. anthracis*280/6-15-B амплифицировались все три гена.



1– бeнд-*pag*(pXO1) размером 747 пн; 2– бeнд-*cap*- ген (pXO2), размером 264 пн; 3 – бeнд Ba813, размером 152 пн; 1-3 – образцы вакцинного штамма 55-VNIIIVViM; 4-6– штамм СТИ1; 7–вирулентный штамм280/6-15-B

Рис.1.Результаты идентификации *B. anthracis*

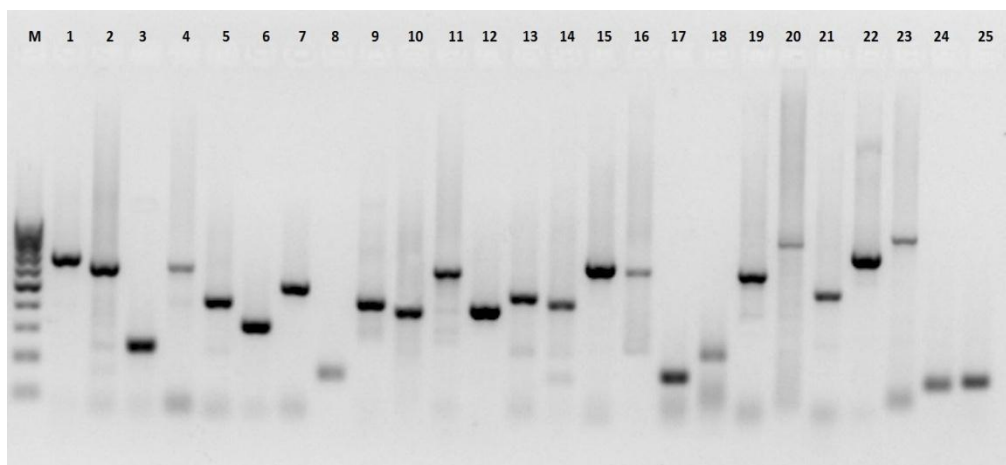
Band 1–*pag* (pXO1) of 747bp; Band 2– *cap* -gen (pXO2), 264 bp in size; and Band 3– Ba813, size 152 bp; 1-3 – samples of vaccine strain 55-VNIIIVViM; 3-6– strains of STI-1; 7– virulent strain 280/6-15-B

Fig.1. Results of identification *B. anthracis*

Включение *proB* (Ba813) в качестве внутреннего контроля является важным фактором в оценке естественно аттенуированных штаммов, в которых отсутствует одна или обе плазмиды, хотя вероятность потери pXO2 выше [25]. На основании полученных результатов была подтверждена видовая принадлежность штаммов и отсутствие плазмиды pXO2 в вакцинных штаммах.

MLVA типирование было проведено с использованием капиллярного электрофореза. Полученные значения размеровVNTR повторов приведены в таблице 2.Капиллярное разделение обладает преимуществами при проведении MLVA типирования в сравнении с электрофорезом в агарозном или полиакриламидных гелях. К преимуществам можно отнести высокую разрешающую способность до одного нуклеотида и возможность анализа нескольких локусов за счет мечения локусов разными флуоресцентными красителями [26]. Несмотря на высокую воспроизводимость получаемых результатов при капиллярном электрофорезе, нередко получаемый размер ПЦР продуктов отличается от фактических значений. Это, возможно, связано с типами приборов, характеристикой используемого полимера, разницей в движении размерного стандарта и ПЦР продуктов, отличие в движение ПЦР продуктов из-за конформаций. Обычно размер на всех аллелях изменяется на постоянное значение, но в некоторых случаях смещение увеличивается с увеличением размера аллеля, прямое секвенирование аллелей повышает достоверность получаемых результатов [27].

В связи с этим определена нуклеотидная последовательность аллелей 23VNTR маркеров методом секвенирования. В результате ПЦР с праймерами, предложеннымиListac соавт., был получен паттерн ПЦР фрагментов, варьирующих по размеру от 120 до более 800 п.н. (рисунок 2).

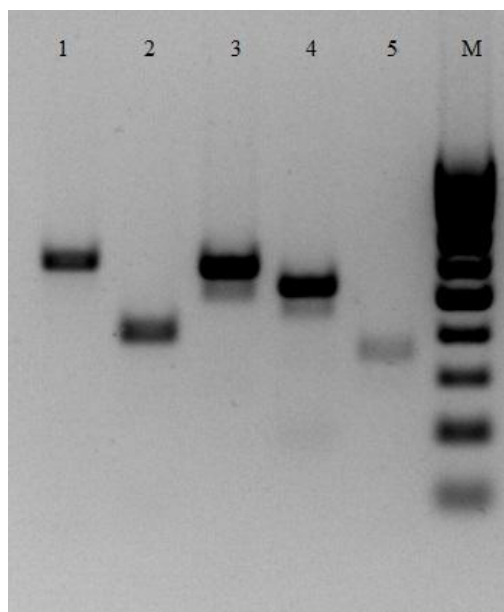


1 – Bam21; 2– vrrC1; 3– Bam53; 4– Bam15; 5– Bam44; 6– vrrA; 7– Bam28; 8– CG3; 9– Bam1; 10– Bam5; 11– Bam24; 12– Bam25; 13– Bam13; 14– Bam34; 15– Bam23; 16– Bam3; 17– vrrB2; 18– vrrB1; 19– vrrC2; 20– Bam31; 21– Bam51; 22– Bam22; 23– Bam30; 24– pX01; 25– pX02

Рис.2. Результаты моноплекс ПЦР с праймерами MLVA25

Fig.2. Results of monoplex PCR assays with MLVA25 primers

Локусы vrrB1, CG3, pX01, pX02, vrrB2 имели размер менее 300 п.н., что не позволило получить прямую нуклеотидную последовательность с использованием праймеров, предложенных Lista с соавт. В связи с этим была поставлена ПЦР реакция с подобранными праймерами, фланкирующими данный участок на достаточном удалении. Использование подобранных праймеров позволило получить ПЦР фрагменты от 350 до 550 п.н. (рисунок 3).



1– vrrB1; 2– CG3; 3– pX01; 4– pX02; 5– vrrB2; M–маркерразмером 100 bp.

Рис. 3. Результаты моноплекс ПЦР с подобранными праймерами

Fig. 3. Results of the PCR monoplex with new primers

Прямую нуклеотидную последовательность локуса Bam30 не удалось получить из-за большой протяженности фрагмента и размера тандемных повторов, в дальнейшем требуется клонирование и подбор дополнительных праймеров. Фактические размеры остальных фрагментов отражены в таблице 2.

Таблица 2. Корректировочная таблица аллелей

Table 2. Correction tables of alleles

| Название локуса (размер повтора, п.н.) | 55 ВНИИВВиМ Депозитор 1 | | 55 ВНИИВВиМ Депозитор 2 | | 55 ВНИИВВиМ Депозитор 3 | | СТИ-1 Депозитор 1 | | СТИ-1 Депозитор 1 | | СТИ-1 Депозитор 3 | | Вирулентный штамм 280/6-15-B Virulentstrain 280/6-15-B | |
|--|----------------------------|--------|----------------------------|------|----------------------------|------|----------------------|------|----------------------|------|----------------------|------|---|------|
| | 55-VNIIVViM Depositor 1 | | 55-VNIIVViM Depositor 2 | | 55-VNIIVViM Depositor 3 | | STI-1 Depositor 1 | | STI-1 Depositor 2 | | STI-1 Depositor 3 | | | |
| The name of locus (size of repeat, bp) | Н.р.* | Ф.р.** | Н.р. | Ф.р. | Н.р. | Ф.р. | Н.р. | Ф.р. | Н.р. | Ф.р. | Н.р. | Ф.р. | Н.р. | Ф.р. |
| Vams1(21) | 423.96 | 422 | 424.04 | 422 | 423.92 | 422 | 423.97 | 422 | 423.98 | 422 | 423.97 | 422 | 423.95 | 422 |
| Vams3(15) | 516.59 | 519 | 516.69 | 519 | 516.81 | 519 | 516.76 | 519 | 516.76 | 519 | 516.83 | 519 | 378.69 | 385 |
| Vams5 (39) | 378.57 | 385 | 378.53 | 385 | 378.65 | 385 | 378.61 | 385 | 378.48 | 385 | 378.61 | 385 | 378.69 | 385 |
| Vams13(9) | 451.39 | 454 | 451.39 | 454 | 451.42 | 454 | 451.44 | 454 | 451.42 | 454 | 451.35 | 454 | 451.4 | 454 |
| Vams15(9) | 608.91 | 607 | 608.87 | 607 | 608.96 | 607 | 608.96 | 607 | 608.9 | 607 | 608.9 | 607 | 608.93 | 607 |
| Vams21 (45) | 662.32 | 676 | 662.34 | 676 | 662.36 | 676 | 662.26 | 676 | 662.25 | 676 | 662.26 | 676 | 662.03 | 676 |
| Vams22 (36) | 716.71 | 735 | 716.52 | 735 | 717.21 | 735 | 716.89 | 735 | 716.57 | 735 | 716.86 | 735 | 716.87 | 735 |
| Vams23 (42) | 675.04 | 693 | 675.17 | 693 | 675.44 | 693 | 675.2 | 693 | 674.89 | 693 | 675.13 | 693 | 633.43 | 651 |
| Vams24(42) | 597.05 | 595 | 597.01 | 595 | 597.06 | 595 | 597.07 | 595 | 597.06 | 595 | 597.11 | 595 | 597.06 | 595 |
| Vams25 (15) | 393.18 | 391 | 393.15 | 391 | 393.2 | 391 | 393.22 | 391 | 393.19 | 391 | 393.15 | 391 | 393.11 | 391 |
| Vams28 (24) | 497.69 | 493 | 497.74 | 493 | 477.65 | 493 | 497.62 | 493 | 497.58 | 493 | 497.62 | 493 | 497.63 | 493 |
| Vams30 (9) | 891.49 | Н/Д | 891.49 | Н/Д | 891.56 | Н/Д | 891.67 | Н/Д | 891.54 | Н/Д | 891.67 | Н/Д | 864.39 | Н/Д |
| Vams31 (9) | 765.88 | 771 | 765.78 | 771 | 766.03 | 771 | 765.92 | 771 | 766.02 | 771 | 766.03 | 771 | 766 | 771 |
| Vams34 (39) | 416.08 | 425 | 416.17 | 425 | 416.15 | 425 | 416.12 | 425 | 416.15 | 425 | 416.15 | 425 | 416.0 | 425 |
| Vams44 (39) | 408.21 | 417 | 408.29 | 417 | 408.54 | 417 | 408.49 | 417 | 408.15 | 417 | 408.5 | 417 | 408.58 | 417 |
| Vams51(45) | 497.69 | 493 | 497.67 | 493 | 497.4 | 493 | 497.73 | 493 | 497.74 | 493 | 497.75 | 493 | 497.78 | 493 |
| vrrA (12) | 307.35 | 313 | 307.28 | 313 | 307.39 | 313 | 307.33 | 313 | 307.38 | 313 | 307.32 | 313 | 307.18 | 313 |
| vrrB1(9) | 223.67 | 229 | 223.62 | 229 | 223.67 | 229 | 223.63 | 229 | 223.66 | 229 | 223.64 | 229 | 223.66 | 229 |
| vrrB2 (9) | 154.96 | 162 | 155.01 | 162 | 155.05 | 162 | 155.06 | 162 | 154.85 | 162 | 155.05 | 162 | 155.07 | 162 |
| vrrC1 (9) | 605.38 | 616 | 605.17 | 616 | 605.53 | 616 | 605.22 | 616 | 605.13 | 616 | 605.32 | 616 | 605.53 | 616 |
| vrrC2 (18) | 594.48 | 604 | 594.56 | 604 | 594.54 | 604 | 594.52 | 604 | 594.45 | 604 | 594.56 | 604 | 594.59 | 604 |
| CG3 (5) | 148.32 | 153 | 148.54 | 153 | 148.49 | 153 | 148.38 | 153 | 148.31 | 153 | 148.39 | 153 | 148.59 | 153 |
| pX01(3) | 123.6 | 129 | 123.7 | 129 | 123.75 | 129 | 126.74 | 132 | 126.51 | 132 | 126.52 | 132 | 129.72 | 135 |
| pX02 (2) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 134.8 | 139 |

*Н.р. – наблюдаемый размер при капиллярном разделении;
**Ф.р. – фактический размер на основании прямой нуклеотидной последовательности;
***Н/Д – нет данных

*N.p. – observed size at capillary separation;
**F.p. – actual size based on direct nucleotide sequence;
*** N/D – no data

Наблюдаемый и фактический размер аллелей отличался в некоторых локусах на 19 нуклеотидов Vams22 (18 нуклеотидов у локуса Vams23), что в некоторых случаях составляло 50% длины повтора. Таким образом, верификация данных прямым секвенированием на первом этапе внедрения процедуры MLVA типирования является важным шагом. В последующем создание типовых штаммов (образцов ДНК) позволит корректировать значения без прямого секвенирования.

Назначение аллелей осуществляли согласно размеру и скорректированным правилам назначения аллелей штамма AmesAncestor [28], за исключением локуса Vam30, значение которого было определено согласно Lista [18]. В результате проведенных исследований значения 24VNTR повторов получены для всех анализируемых вакцинных штаммов, для полевого штамма получены значения всех 25 аллелей (таблица 3). Дубликация пиков, указывающая на присутствие двух штаммов или диссоциацию, в образцах не выявлена. Вакцинные штаммы *B. anthracis* 55 ВНИИВВиМи *B. anthracis* СТИ-1 имели единственное различие по локусу pXO1aat. Результаты амплификации локусов pXO2at, локализованных на плазмиде капсулообразования pXO2, были отрицательны у всех вакцинных штаммов, что связано с одной из важнейших характеристик этих штаммов – отсутствием данной плазмиды. У вирулентного штамма различались локусы Vam3, Vam23, pXO1, а также присутствовала плаزمида pXO2.

Таблица 3. Генетические профили вакцинных штаммов *B. anthracis*, депонированные в Казахстане

Table 3. Genetic profiles of vaccine strains of *B. anthracis* deposited in Kazakhstan

| Название VNTR локуса The name of VNTR locus | 55 ВНИИВВиМи Депозитор 1 55-VNПVVIM Depositor 1 | 55 ВНИИВВиМи Депозитор 2 55-VNПVVIM Depositor 2 | 55 ВНИИВВиМи Депозитор 3 55-VNПVVIM Depositor 3 | СТИ-1 Депозитор 1 STI-1 Depositor 1 | СТИ-1 Депозитор 2 STI-1 Depositor 2 | СТИ-1 Депозитор 3 STI-1 Depositor 2 | 280/6-15-B Virulentstrain | <i>In silico</i> MLVA СТИ-1 (STI-1) | <i>In silico</i> MLVA 55 ВНИИВВиМи (55-VNПVVIM) |
|--|--|--|--|--|--|--|------------------------------|--|--|
| Vams1 | 13 | 13 | 13 | 13 | 13 | 13 | 13 | 13 | 13 |
| Vams3 | 24 | 24 | 24 | 24 | 24 | 24 | 30 | 18 | 24 |
| Vams5 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 6 | 7 |
| Vams13 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 |
| Vams15 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 |
| Vams21 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Vams22 | 16 | 16 | 16 | 16 | 16 | 16 | 16 | 15 | НД |
| Vams23 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 11 | 11 | НД |
| Vams24 | 11 | 11 | 11 | 11 | 11 | 11 | 11 | 9 | 11 |
| Vams25 | 13 | 13 | 13 | 13 | 13 | 13 | 13 | 13 | 13 |
| Vams28 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 |
| Vams30 | 75 | 75 | 75 | 75 | 75 | 75 | 72 | НД | НД |
| Vams31 | 64 | 64 | 64 | 64 | 64 | 64 | 64 | НД | 64 |
| Vams34 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 |
| Vams44 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 |
| Vams51 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | НД | 9 |
| vrrA | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| vrrB1 | 19 | 19 | 19 | 19 | 19 | 19 | 19 | 19 | 19 |
| vrrB2 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 |
| vrrC1 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 | 57 |
| vrrC2 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 |
| CG3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| pXO1 | 7 | 7 | 7 | 8 | 8 | 8 | 9 | 7 | 8 |
| pXO2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9 | 0 | 0 |
| *Н/Д – нет данных | | | | | | | | | |
| *Н/Д – no data | | | | | | | | | |

Дополнительно был проведен *in silico* MLVA анализ штаммов *Bacillus anthracis* 55 ВНИИВВиМ (NZ_MLJX0000000.1) и *Bacillus anthracis* СТИ-1 (NZ_MJAW0000000.1) на основании полногеномных данных (таблица 3). Для штамма *Bacillus anthracis* 55 ВНИИВВиМ методом *in silico* не удалось получить значения локусов Vam22, Vam 23и Vam30. Для штамма *Bacillus anthracis* СТИ-1не удалось получить значения локусов Vam30, Vam31 иVam51, так как локусы находились в дистальной части контигов. Значения локусов Vam5, Vam22, Vam23 и Vam24вакцинного штамма *Bacillus anthracis* СТИ-1отличались от полученных нами результатов, что, возможно, связано с ошибками в сборке контигов при полногеномном секвенировании или с изменением в количестве tandemных повторов в результате длительного депонирования штаммов в коллекции микроорганизмов. В последующем для совершенствования процедуры определения генетической стабильности и отработки инструкции контроля качества вакцин необходимо провести MLVA анализ типовых культур вакцинных штаммов, а также штаммов различных производителей. Включение различных партий позволит улучшить понимание о генетической стабильности готовых вакцин.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование метода MLVA25 позволяет различать штаммы сибирезывенных вакцин на генетическом уровне, что является немаловажным преимуществом при контроле вакцинных препаратов. Впервые были получены MLVA профили 24 VNTR повторов вакцинных штаммов депонированных в Казахстане. Результаты метода MLVA25 иллюстрируют генетическую однородность вакцинных штаммов различных производителей, различие в локусе рХО1 могут быть использованы при дифференциации вакцинных штаммов. Полученные результаты могут быть применены в ветеринарной практике при оценке генетической стабильности вакцинных штаммов и достоверность их происхождения.

Финансирование

Работа выполнялась в рамках проекта «Разработка протокола MLVA типирования штаммов *Bacillus anthracis*» в рамках реализации государственного заказа по научно-технической программе «Создание диагностических препаратов и вакцин на основе использования молекулярно-генетических методов для обеспечения ветеринарной безопасности».

ЛИТЕРАТУРА

1. Goel A.K. Anthrax: A disease of biowarfare and public health importance // World J Clin Cases. – 2015. – Vol. 3. – P. 20-33.
2. WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee. Anthrax in Humans and Animals // 4th edition. – Geneva: World Health Organization, 2008.
3. Holtz T.H., Ackelsberg J., Kool J.L., et al. Isolated case of bioterrorism-related inhalational anthrax, New York City 2001 //Emerg. Infect.Dis.– 2003. – Vol. 9. – P. 689-696.
4. Akhtar P., Khan S.A. Two independent replicons can support replication of the anthrax toxin-encoding plasmid рХО1 of *Bacillus anthracis* // Plasmid. – 2012. – Vol. 67. – P. 111-117.
5. Fasanella A., Losito S., Trotta T., Adone R., Massa S., Ciuchini F. and Chiocco D. Detection of anthrax vaccine virulence factors by polymerase chain reaction // Vaccine. – 2001. – Vol. 19. – P. 4214-4218.
6. Cataldi A., Mock M. and Bentancor L. Characterization of *Bacillus anthracis* strains used for vaccination // J. Appl. Microbiol. – 2000. – Vol. 88.–P. 648-654.
7. Бакулов И.А., Гаврилов В.А. Оценка эффективности 10-летнего применения вакцины против сибирской язвы животных из штамма 55-ВНИИВВиМ // Ветеринария. – 1994. – №8. – С.11-15.
8. Leppla S.H., Klimpel K.R., Singh Y., et al. Interaction of anthrax toxin with mammalian cell //Salisbury Medical Bulletin. – 1996. – Vol. 87.– P. 91.
9. Demicheli V., et al. The effectiveness and safety of vaccines against human anthrax: a systematic //Vaccine. – 1998.– Vol. 16. – P. 880-884.
10. http://www.kazinform.kz/ru/vspyshki-sibirskoy-yazvy-v-kazahstane-proizoshli-iz-zanekachestvennyh-vakcin_a3026764.
11. Van Ert M.N., Easterday W.R., Simonson T.S., et al. Strain-specific single-nucleotide polymorphism assays for the *Bacillus anthracis* Ames strain // J.Clin.Microbiol. – 2007. – Vol.45. – P. 47-53.

12. Simonson T.S., Okinaka R.T., Wang B., Easterday W.R., Huynh L., U'Ren J.M., et al. *Bacillus anthracis* in China and its relationship to worldwide lineages // *BMC Microbiol.*–2009. –Vol. 9. – P.71.
13. Keim P., Price L.B., Klevytska A.M., Smith K.L., Schupp J.M., Okinaka R., Jackson P.J., and Hugh-Jones M.E. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis* // *J. Bacteriol.* – 2000.– Vol. 182. – P. 2928-2936.
14. Andersen G.L., Simchock J.M., Wilson K.H. Identification of a region of genetic variability among *Bacillus anthracis* strains and related species // *J. Bacteriol.* – 1996. – Vol. 178. –P. 377-384.
15. Keim P., Van Ert M.N., Pearson T., Vogler A.J., Huynh L.Y., Wagner D.M. Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales // *Infect. Genet. Evol.*– 2004. – Vol. 4. – P. 205-213.
16. Pearson T., Busch J.D., Ravel J., et al. Phylogenetic discovery bias in *Bacillus anthracis* using single-nucleotide polymorphisms from whole-genome sequencing // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – Vol.101. – P. 13536-13541.
17. Le Fleche 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. – Vol.1.
18. Lista F., Faggioni G., Valjevac S., Ciammaruconi A., et al. Genotyping of *Bacillus anthracis* strains based on automated capillary 25-loci multiple locus variable-number tandem repeats analysis // *BMC Microbiol.* – 2006. – Vol.6.
19. MLVA web-service <http://microbesgenotyping.i2bc.paris-saclay.fr>
20. Garcia-Yoldi D., Le Fleche P., Marin C.M., De Miguel M.J., Munoz P.M., Vergnaud G., López-Goni I. Assessment of genetic stability of *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine strain by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis // *Vaccine.* – 2007. – Vol.12. – P.2858-2862.
21. Dorneles E.M., de Faria A.P., Pauletti R.B., Santana J.A., Caldeira G.A., Heinemann M.B., Titze-de-Almeida R., Lage A.P. Genetic stability of *Brucella abortus* S19 and RB51 vaccine strains by multiple locus variable number tandem repeat analysis (MLVA16) // *Vaccine.* – 2013. – Vol.1. – P.4856-4859.
22. Ramiisse V., Patra G., Garrigue H., Guesdon J., Mock M. Identification and characterization of *Bacillus anthracis* by multiplex PCR analysis of sequences on plasmids pXO1 and pXO2 and chromosomal DNA // *FEMS Microbiology Letters.*–1996. – Vol.145.– P. 9-16.
23. Thorne C.B. *Bacillus anthracis* // *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetic. American Society for Microbiology. – 1993. –P.113-132.
24. Kolstø A.B., Tourasse N. J.; Økstad O.A. What Sets Apart from Other Species? *Annual Review of Microbiology.* – 2009. – Vol. 63. –P. 451-476.
25. Mock M., Fouet A. Anthrax // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2001. – Vol. 55. – P. 647-671.
26. Lindstedt B.A., Vardund T., Aas L., Kapperud G. Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Salmonella enterica* subsp. Enteric serovar *typhimurium* using PCR multiplexing and multicolor capillary electrophoresis // *J Microbiol Methods.* – 2004. – Vol. 59. – P. 163-72.
27. Pasqualotto A.C., Denning D.W., Anderson M.J. A cautionary tale: lack of consistency in allele sizes between two laboratories for a published multilocus microsatellite typing system // *J Clin Microbiol.* – 2007. – Vol. 9. – P. 522-528.
28. Thierry S., Tourterel C., Le Flèche P., Derzelle S., Dekhil N., Mendy C., Colaneri C., Vergnaud G., Madani N. Genotyping of French *Bacillus anthracis* strains based on 31-loci multi locus VNTR analysis: epidemiology, marker evaluation, and update of the internet genotype database // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 5.

REFERENCES

1. Goel A.K. Anthrax: A disease of biowarfare and public health importance. *World J. Clin Cases*, 2015, vol.16, pp. 20-33. <http://dx.doi.org/10.12998/wjcc.v3.i1.20>.
2. WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee. Anthrax in Humans and Animals. 4th edition. Geneva: World Health Organization, 2008.
3. Holtz T.H., Ackelsberg J., Kool J.L., et al. Isolated case of bioterrorism-related inhalational anthrax. New York City, 2001. *Emerg. Infect. Dis.*, 2003, vol. 9, pp.689-696.
4. Akhtar P., Khan S.A. Two independent replicons can support replication of the anthrax toxin-encoding plasmid pXO1 of *Bacillus anthracis*. *Plasmid*, 2012, vol.67, pp.111-117. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plasmid.2011.12.012>.
5. Fasanella A., Losito S., Trotta T., Adone R., Massa S., Ciuchini F. and Chiocco D. Detection of anthrax vaccine virulence factors by polymerase chain reaction. *Vaccine*, 2001, vol. 19, pp. 4214-4218.
6. Cataldi A., Mock M. and Bentancor L. Characterization of *Bacillus anthracis* strains used for vaccination. *J. Appl. Microbiol.*, 2000, vol. 88, pp.648-654.

7. Bakulov I.A., Gavrilov V.A. Ocenka effektivnosti 10-letnego primeneniya vaccini protiv sibirskoi yazvi zhivotnih iz shtamma 55- VNIIVVIM [Evaluation of the efficacy of a 10-year-old vaccine against anthrax from animals from strain ARSRIVVaM]. *Vetenarya- Veterinary*, 1994, no. 8, pp.11-15.
8. Leppla S.H., Klimpel K.R., Singh Y. Interaction of anthrax toxin with mammalian cells. *Salisbury Medical Bulletin*, 1996, no.87, p. 91.
9. Demicheli V. et al. (1998). The effectiveness and safety of vaccines against human anthrax. *Vaccine*, vol.16, pp.880-884.
10. http://www.kazinform.kz/ru/vspyshki-sibirskoy-yazvy-v-kazahstane-proizoshli-iz-zanekachestvennyh-vakcin_a3026764 (accessed 20 september 2017).
11. Van Ert M.N., Easterday W.R., Simonson T.S., et al. Strain-specific single-nucleotide polymorphism assays for the *Bacillus anthracis* Ames strain. *J.Clin.Microbiol.*,2007, vol. 45, pp. 47-53.
12. Simonson T.S., Okinaka R.T., Wang B., Easterday W.R., Huynh L., U'Ren J.M, et al. *Bacillus anthracis* in China and its relationship to worldwide lineages. *BMC Microbiol*, 2009, vol. 9, p.71.
13. Keim P., PriceL.B., KlevytskaA.M., SmithK.L., SchuppJ.M., Okinaka R., JacksonP.J., and Hugh-JonesM.E. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.*,2000, vol. 182, pp. 2928-2936.
14. Andersen G.L., Simchock J.M., Wilson K.H. Identification of a region of genetic variability among *Bacillus anthracis* strains and related species. *J.Bacteriol.*, 1996, vol.178, pp.377-384.
15. Keim P., Van Ert M.N., Pearson T., Vogler A.J., Huynh L.Y., Wagner D.M. Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales. *Infect Genet Evol.*,2004, vol.4, pp.205-213.
16. Pearson T., Busch J.D., Ravel J., et al. Phylogenetic discovery bias in *Bacillus anthracis* using single-nucleotide polymorphisms from whole-genome sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,2004, vol.101, pp.13536-13541.
17. Le Fleche 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, vol.1.
18. Lista F., Faggioni G., Valjevac S., Ciammaruconi A., et al. Genotyping of *Bacillus anthracis* strains based on automated capillary 25-loci multiple locus variable-number tandem repeats analysis. *BMC Microbiol*.2006, vol. 6. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-6-33>.
19. MLVA web-service <http://microbesgenotyping.i2bc.paris-saclay.fr> (accessed 20 september 2017).
20. Garcia-Yoldi D., Le Fleche P., Marin C.M., De Miguel M.J., Munoz P.M., Vergnaud G., López-Goni I. Assessment of genetic stability of *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine strain by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *Vaccine*, 2007, vol.12,pp.2858-2862.
21. Dorneles E.M., de Faria A.P., Pauletti R.B., Santana J.A., Caldeira G.A., Heinemann M.B., Titz-de-Almeida R., Lage A.P. Genetic stability of *Brucella abortus* S19 and RB51 vaccine strains by multiple locus variable number tandem repeat analysis (MLVA16). *Vaccine*, 2013, vol.1, pp.4856-4859.
22. Ramiisse V., Patra G., Garrigue H., Guesdon J., Mock M. Identification and characterization of *Bacillus anthracis* by multiplex PCR analysis of sequences on plasmids pXO1 and pXO2 and chromosomal DNA. *FEMS Microbiology Letters*, 1996, vol.145, pp. 9-16.
23. Thorne C.B. *Bacillus anthracis*. *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics. *American Society for Microbiology*, 1993, pp. 113-132.
24. Kolstø A.B., Tourasse N.J., Økstad O.A. What Sets Apart from Other Species? *Annual Review of Microbiology*, 2009, vol.63, pp.451-476. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073255>.
25. Mock M., Fouet A. Anthrax. *Annu. Rev. Microbiol.*,2001, vol. 55, pp. 647-671.
26. Lindstedt B.A., Vardund T., Aas L., Kapperud G. Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Salmonella enterica* subsp. Enteric serovar *Typhimurium* using PCR multiplexing and multicolor capillary electrophoresis. *J.Microbiol.Methods.*, 2004, vol. 59, pp. 163-172.
27. Pasqualotto A.C., Denning D.W., Anderson M.J. A cautionary tale: lack of consistency in allele sizes between two laboratories for a published multilocus microsatellite typing system. *J.Clin.Microbiol.*,2007, vol. 9, pp. 522-528. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02136-06>.
28. Thierry S., Tourterel C., Le Flèche P., Derzelle S., Dekhil N., Mendy C., Colaneri C., Vergnaud G., Madani N. Genotyping of French *Bacillus anthracis* strains based on 31-loci multi locus VNTR analysis: epidemiology, marker evaluation, and update of the internet genotype database. *PLoS One*, 2014, vol. 5. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0095131>.

**MLVA- 25 ӘДІСІМЕН *Bacillus anthracis* СТИ-1 ЖӘНЕ *B. anthracis* 55
ВВМЖРҒЗИ ВАКЦИНДІ ШТАММДАРЫНЫҢ ГЕНЕТИКАЛЫҚ
БІРТЕКТІЛІГІН ТАЛДАУ**

Қайыржанова А.Д.¹, Карибаев Т.Б.,² Шведюк В.Б.,¹ Түлегенов С.Б.,²

Жарова М.К.,² Шевцова Е.С.,¹ Куйбағаров М.А.,¹ Шевцов А.Б.¹

¹Ұлттық биотехнология орталығы

Қорғалжын тас жолы, 13/5, Астана, 010000, Қазақстан

²Ветеринария бойынша ұлттық референттік орталық

Абайдың 150-жылдығына көшесі, 22/3 үй, Астана, 010000, Қазақстан

ТҮЙІН

Тұрақтылықтың генетикалық бақылауы мен штаммды идентификациялау вакцинаны бақылауда елеулі қосымша болуы мүмкін. Сібір жарасының жоғары генетикалық тұрақтылығы ДНҚ-ның жоғары айнымалы аймақтарында хаттамаларды қолдануды талап етеді. Тандемдік қайталаулар гипервариабельді ДНҚ жатады. 25 локустың тандемдік қайталау талдауы (MLVA-25), генотиптің географиялық таралуын бақылауға мүмкіндік бере отырып, өзін *Bacillus anthracis* далалық штаммдарын генотиптеудің жоғарғы дискриминациялық әдісі ретінде ұсынды.

Әдіс вакцинді штаммдардың генетикалық тұрақтылығы мен штаммдық идентификациялауда оңай интерполяциялануы мүмкін. Дегенмен, бүгінгі күнге дейін ТМД елдерінде вакцинациялау үшін қолданылатын MLVA-25 вакцина штаммдарының генотиптері туралы мәліметтер жоқ.

Берілген мақалада MLVA-25 қолдану арқылы Қазақстанның үш депозиторларымен депонирленген *Bacillus anthracis* СТИ-1 және *B. anthracis* 55 ВВМЖРҒЗИ вакцинді штаммдарының генотиптеу нәтижелері келтірілген. Үш депозиторлардың вакцинді штаммдардың MLVA профилі өзара ерекшеленді. *Bacillus anthracis* СТИ-1 пен *B. anthracis* 55 ВВМЖРҒЗИ өзара тек rXO1aat локусында 1 тандемдік қайталау бойынша ерекшеленді. *Bacillus anthracis* СТИ-1 пен *B. anthracis* 55 ВВМЖРҒЗИ MLVA профильдерін салыстыру мен *in silico* әдісімен алынған толық геномды мәліметтер негізінде анықталған локустардың Vam22, Vam23 мағыналарының сәйкес келмеуі, сонымен қатар *Bacillus anthracis* СТИ-1 локустары Vam5 және Vam24.

Зерттеулер, MLVA талдауы жоғарғы дискриминациялық әдіс екенін және вакцинді препараттарды бақылауда қолдануға болатынын көрсетті. Рәсімді стандарттау үшін үлгі дақылдарды талдауды талап етеді.

Негізгі сөздер: *Bacillus anthracis*, MLVA типирование, VNTR аллелдер, вакцинді штаммдар, сібір жарасы.