



УДК 579.25; 579.26; 579.8

## MLVA ГЕНОТИПИРОВАНИЕ *B. ANTHRACIS* ПРИ ФОРМИРОВАНИИ КОЛЛЕКЦИИ РЕПРЕЗЕНТАТИВНЫХ ШТАММОВ

\*Карибаев Т.Б., Бердикулов М.А., Куспеков Р.Н., Тегжанов А.Г., Токаева Д.А.,

Ташкенбаев А.С., Биржанов Т.Б., Айтжанов Ж.Ж., Жумахмет Н.М.,  
Испуллаев Н., Кожакметова Т.Е., Сураганова Ф.Е.

*Национальный референтный центр по ветеринарии*

*ул. Абая, дом 22/3, Нур-Султан, 010000, Казахстан*

*\*karibaev.v7@mail.ru*

### АБСТРАКТ

Сибирская язва инфекционное заболевание, поражающее многие виды млекопитающих и человека. Бактериологическое выделение возбудителя и его идентификация фенотипическими и ПЦР методами остается золотым стандартом. Тем не менее, данные методы не позволяют определять причину вспышки, а именно происхождение их с одного или нескольких источников. Кроме того, возбудители особо опасных инфекций депонируются в Национальных коллекциях, и генотипирование с выбором единственного репрезентативного штамма является необходимым условием, препятствующим потере штаммов с уникальными свойствами, а также депонированию идентичных штаммов. В данном исследовании мы провели MLVA генотипирование 10 изолятов из 5 вспышек сибирской язвы у животных в 2021 году. Полученные MLVA профили позволили дифференцировать изоляты в различных вспышках и подтвердили идентичность генотипов в каждой вспышке. MLVA генотипирование *B. anthracis* может быть рекомендовано в качестве первичного способа генотипирования и выбора уникальных штаммов для пополнения коллекции.

Ключевые слова: сибирская язва, изолят, MLVA, генотипирование, *B. anthracis*, ПЦР.

## ВВЕДЕНИЕ

Сибирская язва - особо опасное зоонозное заболевание, вызываемое аэробным грамположительным спорообразующим микроорганизмом *Bacillus anthracis*. Ежегодно во всем мире регистрируется от 2000 до 20 000 случаев заболевания сибирской язвой [1]. Сибирская язва поражает многие виды теплокровных животных, но чаще всего регистрируется у травоядных млекопитающих [2]. В неволе возможно заражение птиц при вскармливании корма обсеменённого спорами возбудителя, в дикой природе описано естественное инфицирование страусов, хищных птиц, питающие падалью, которые имеют естественный иммунитет, но могут выступать в качестве переносчиков патогенов [3]. Заражение человека обычно происходит в результате контакта с больным животным или инфицированными продуктами и сырьем животного происхождения. В зависимости от способа передачи (контактный, ингаляционный, алиментарный) возникают кожные, респираторные или желудочно-кишечные формы. В последнее время установлены случаи инъекционной формы, вызванные инъекцией героина, зараженного спорами сибирской язвы [4].

Вне организма хозяина *B. anthracis* образует споры устойчивые к воздействию окружающей среды и многих дезинфицирующих средств. Споры сохраняют жизнеспособность в течение десятилетий, вызывая периодические вспышки заболеваний. Вакцинация значительно сократила бремя заболевания среди животных, но, тем не менее, наиболее эндемичными регионами мира являются страны Африки к югу от Сахары, Центральной Азии, Ближнего Востока и Южной Америки [1, 5]. Территория Казахстана эндемична по заболеваемости, с 1933 по 2014 годы в Казахстане зарегистрировано 3997 вспышек, максимальное количество которых приходилось на 1962-1972 годы [6]. Не смотря на поголовный охват восприимчивых сельскохозяйственных животных в программе вакцинации, спорадические случаи заболевания регистрируются повсеместно. Ключевым элементом в ликвидации вспышки является диагностика. Золотым стандартом, которой остается выделение и идентификация чистой культуры [7]. Большое внимание во всем мире уделяется диагностике и контролю за сибирской язвой из-за опасности заболевания. Исторически сложилось, что бактериальные культуры, выделенные при вспышках особо опасных заболеваний, передаются в Национальные коллекции для хранения и последующего изучения. Коллекция позволяет отслеживать эволюционные изменения патогенов и при необходимости могут способствовать разработки средств диагностики и профилактики. Несмотря на важность Национальных коллекций, возникают и трудности в обеспечении жизнеспособности, сохранности и поддержании действующей коллекции. В связи с этим необходимо заполнять коллекции только уникальными бактериальными штаммами, выделенными в одной вспышки. Однако, при проведении диагностических мероприятий с одной вспышки выделяется несколько бактериальных культур, а в случае инфицирования нескольких животных и объектов внешней среды численность может исчисляться десятками. Все это приводит к необходимости внедрения высоко дискриминационных методов типирования изолятов *B. anthracis* позволяющих идентифицировать идентичные культуры и отбирать уникальные штаммы для депонирования. Наиболее целесообразно использовать методы типирования, основанные на ДНК, из-за их высокой дискриминационной способности и безопасности работы в отличии от традиционных микробиологических методов.

Первые попытки генотипирования были затруднены, из-за консервативности генома и высокой клональной эволюции [8]. Например, анализ полиморфизмов длин амплифицированных фрагментов (amplified fragment length polymorphism (AFLP)) 78 штаммов *B. anthracis* из разных географических мест позволил выявить только 31 полиморфный локус [9]. Секвенирование переменных AFLP локусов позволило идентифицировать варьирующие по числу тандемные повторы (variable-number tandem repeat (VNTR)). Первый мультилокусный анализ переменных тандемных повторов MLVA включал в себя 8 VNTR локусов (*vtrA*, *vtrB1*, *vtrB2*, *vtrC1*, *vtrC2* и *CG3*) и два

плазмидных маркера (pXO1 и pXO2). Использование данной панели локусов (MLVA8) позволило разделять штаммы *B. anthracis* на основные филогенетические ветви А, В и С с наиболее крупными группами молекулярного разнообразия А1а, А3а, А4 и В1 [10]. MLVA8 применялся в многочисленных исследованиях при изучении генетического разнообразия *B. anthracis* во всем мире [11, 12]. Le Flèche P. с соавторами предложили схему MLVA20 которая включала в себя 14 дополнительных полиморфных маркеров (Bams1, 3, 5, 7, 13, 15, 21, 22, 23, 24, 25, 28, 30, 31), что значительно улучшило разрешающую способность метода. Определение размера фрагментов ДНК осуществлялось на стандартных агарозных гелях, окрашенных бромидом этидия [13]. Для более быстрой и точной системы генотипирования Lista F. с соавторами предложили автоматизированный капиллярный метод, определения размеров локусов. Предложенная схема типирования состоит из 25 VNTR маркеров (MLVA25), включающая в себя маркеры MLVA8 и 14 дополнительных локусов, предложенных ранее Le Flèche et al. (bams01, 03, 05, 13, 15, 21, 22, 23, 24, 25, 28, 30 и 31; не включен: bams07) и 4 новых маркера (bams34, 44, 51 и 53) [14]. Объединение всех VNTR локусов привело к формированию панели генотипирования MLVA31, которая включает все VNTR локусы, описанные в геноме *B. anthracis*, за исключением однонуклеотидных повторов. MLVA31 обладает высокой дискриминационной способностью и позволяет дифференцировать штаммы из различных вспышек [15, 16]. В связи с этим целью нашей работы заключаюся в апробации методологии MLVA генотипирования при генотипировании изолятов из вспышек сибирской язвы на территории и Казахстана в 2021 году и оценки метода при отборе штаммов для депонирования.

## Материалы и методы

Выделение бактериальных культур. Выделение бактериальных культур из биологического материала осуществляли методом прямого посева на питательный агар (ПА) и питательный бульон (ПБ) (Hi-Media), инкубировали при 37°C в течение 24 часов, единичные типичные по морфологическим признакам колонии пересеивали и подвергали типизации. С питательного бульона делали посев на ПА и единичные колонии пересеивали для дальнейшей типизации. Из проб объектов внешней среды готовили суспензию и заражали двух мышей, в случае падежа из внутренних органов выделяли чистые культуры. Идентификацию возбудителя сибирской язвы проводили по характеру роста, морфологии микроба и наличию капсул (в мазках из исходного материала или павших лабораторных животных). Дополнительно определяли подвижность, гемолитические свойства, фаготипирование (бактериофаг диагностический сибиреязвенный жидкий ГАММА А-26), а также проводили идентификацию плазмид в ПЦР с детекцией в режиме реального времени.

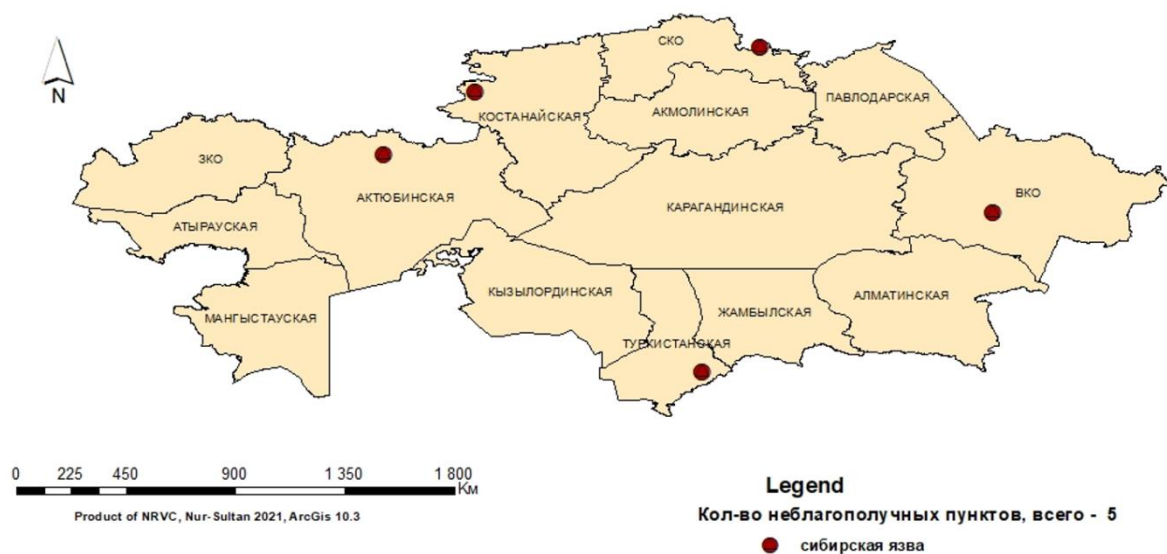
Выделение ДНК. Выделение ДНК проводили с использованием набора «QIAamp DNA Mini Kit» производства фирмы QIAGEN (США) согласно инструкции производителя. Полученный раствор ДНК пропускали через 0,22 мкм фильтр, с целью стерилизации от возможных сохранных спор *Bacillus anthracis*.

MLVA генотипирование. 31 VNTR локус были амплифицированы в 7 реакция, концентрацию праймеров и распределения в реакционных смесях использовали согласно [17, 18, 19]. ПЦР смесь включала: 0,2 мМ каждого дНТФ; 1-х ПЦР буфер (20 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 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 ABI3130xl (Applied Biosystems, Tokyo, Japan), с POP 7 и размерным стандартом LIZ 1200. Анализ размеров VNTR повторов проводили с использованием программного обеспечения GeneMapper 4.1 (Applied Biosystems). Кластерный анализ был выполнен с использованием BioNumerics version 8 (Applied-Maths, Laethem-Saint-Martin, Belgium).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ вспышек и выделение бактериальных культур. За 10 месяцев 2021 года на территории Казахстана было зарегистрировано 5 вспышек заболевания сибирской язвы. В Денисовском районе Кустанайской области случай заболевания сибирской язвы был зарегистрирован 7 июля, всего пало 49 животных. В Аягузском районе Восточно-Казахстанской области 28 июля был зарегистрирован очаг сибирской язвы после установления диагноза у людей, участвующих в вынужденном убою инфицированного животного. 28 августа в Северо-Казахстанской области Акжарском районе зарегистрирован случай заболевания сибирской язвы, где пало 6 голов крупного рогатого скота. 10 сентября Толебиском районе Туркестанской области был зарегистрирован очаг сибирской язвы, в котором при вынужденном убою сибирской язвой заразились люди. В Хромтауском районе Актюбинской области 10 сентября также зарегистрирован очаг сибирской язвы, в котором пало 7 голов КРС. Географическое расположение неблагополучных пунктов показано на рисунке 1.

**Эпизоотическое состояние в Республике Казахстан по сибирской язве за 10 месяцев (январь-октябрь) 2021 г**



**Рис. 1.** Распределение вспышек сибирской язву за 10 месяцев 2021 года

Из материала, доставленного в Национальный референтный центр по ветеринарии, было выделено 10 бактериальных культур (таблица 1).

**Таблица 1.** Данные о выделенных культурах *B. anthracis*

Шифр культуры	Область	Район	Объект выделения	Дата
V.ant_294-1	Костанайская	Денисовский	Ухо КРС	09.08.2021
V.ant_294-2	Костанайская	Денисовский	Ухо КРС	09.08.2021
V.ant_294-3	Костанайская	Денисовский	Ухо КРС	09.08.2021
V.ant_356-5	Костанайская	Денисовский	Ухо КРС	09.08.2021
V.ant_357-1	Восточно-Казахстанская	Аягозский	Почва	11.08.2021
V.ant_357-3	Восточно-Казахстанская	Аягозский	Шкура КРС	11.08.2021
V.ant_357-4	Восточно-Казахстанская	Аягозский	Шкура КРС	11.08.2021

B.ant_381	Северо-Казахстанская	Акжарский	Ухо КРС	27.08.2021
B.ant_394	Актюбинская	Хромтауский	Ухо КРС	09.09.2021
B.ant_H-94	Туркестанская	Толепбийский	Почва	29.06.2021

Во всех выделенных бактериальных культурах при микроскопическом исследовании была установлена капсула, культуры не обладали подвижностью, не приводили к гемолизу эритроцитов, лизировались бактериофагом ГАММА А-26. Методом ПЦР во всех выделенных культурах были выявлены плазмиды рОХ1 и рОХ2.

**MLVA31 генотипирование. Значения 31 VNTR локуса были получены во всех анализируемых образцах. 14 локусов (Bams24, Bams23, Bams53, Bams44, BaVNTR16, Bams25, vrrB2, Bams22, BaVNTR12, Bams51, Bams21, Bams15, vrrB1 и vrrA) были идентичными во всех 10 образцах и, следовательно, не имели дискриминационной силы. Из оставшихся 17 локусов наибольшая варибельность была установлена в локусах рОХ1, Bams31, Bams30, Bams28 (рисунок 2).**

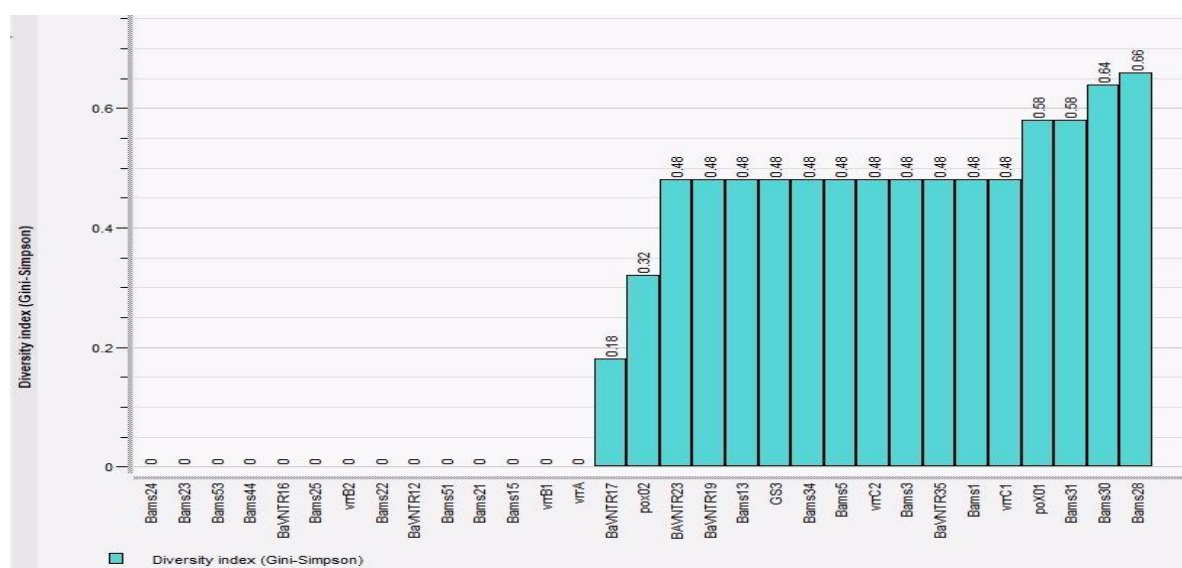


Рис. 2. Дискриминационный индекс 31 VNTR локуса

Ранее описывалось избыточность панели MLVA 31 для дифференциации штаммов *B. anthracis* циркулирующих во Франции и отрицательный вклад локусов bams21, bams25 и bams28, vrrB2, bams24, bams44 и vntr19 [19]. При генотипировании 99 изолятов из Австралии 13 из 25 локусов были инвариантны, но при этом локус Bams22 имел максимальную дискриминационную силу [20]. В то время как в наших 10 образцах он имел единственный вариант аллели. Таким образом, при оптимизации панели MLVA генотипирования необходимо учитывать индексы дискриминации локусов на определенных территориях.



MLVA генотипы были использованы для кластеризации образцов с использованием алгоритма UPGMA (рисунок 3). 10 анализируемых изолятов из 5 вспышек кластеризовались в 5 генотипов.

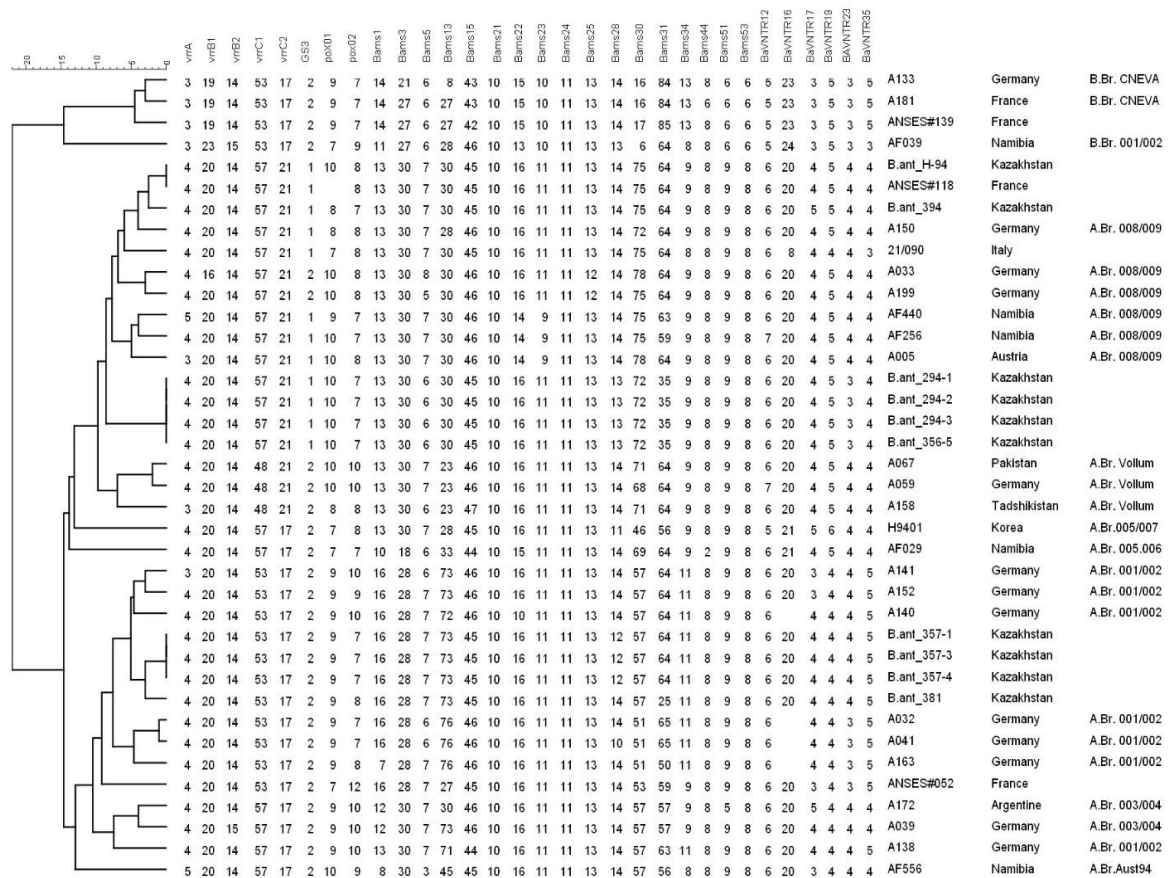


Рис. 3. Кластерный анализ 10 штаммов *B. anthracis* на основании MLVA31

Изолят B.ant\_H-94 из Туркестанской области полностью идентичен штамму Anses#118 из Франции за исключением плазмидного локуса pOX1. Генетическая однородность штаммов объясняется тем, что микросателлиты проявляют изменчивость и подвержены гомоплазии [21]. При этом определенный генотип может встречаться более чем один раз в разных местах или даже во время субкультивирования в лаборатории. Изолят B.ant\_394 из Актюбинской области расположен отдельной ветвью между европейскими штаммами. 4 изолята (B.ant\_294-1, B.ant\_294-2, B.ant\_294-3 и B.ant\_356-5) выделенные из одной вспышки в Кустанайской области не имеют отличий во всех локусах MLVA профиля. Данная группа изолятов по MLVA профилю расположена ближе к генетической линии A.Br. 008/009. Линия A.Br. 008/009 имеет самое широкое распространение и доминирует в большинстве Европейских стран и стран Азии, в связи с чем, она также именуется Транс Евразийская ветвь (ТЕА) [22]. Единичные штаммы выделены на Африканском и Американском континентах, они были завезены из Евразии в результате деятельности человека [23, 24].

Изоляты B.ant\_357-1, B.ant\_357-3 и B.ant\_357-4, выделенные из объектов внешней среды и биологического материала животных вспышки в Восточно-Казахстанской области, лежат на одной ветви и не имеют между собой отличий. Изолят B.ant\_381 из Северо-Казахстанской области лежит отдельной ветвью рядом со штаммами из ВКО, но имеет отличия в трех локусах (pOX2, Vams28, Vams31). Данная группа изолятов расположена между штаммами относящимися к генетической линии A.Br 001/002, которая широко распространена в Евразии и выделяется в соседних странах [25, 26].

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Исследование демонстрирует эффективность использования MLVA генотипирования при первичном генотипировании изолятов выделенных во вспышках сибирской язвы. Метод позволил получить идентичные генотипы среди изолятов выделенных из разных объектов одной вспышки и отличать изоляты в не связанных вспышках и выбрать по одному уникальному штамму для последующего депонирования.

## **Финансирование**

Исследования проводились в рамках Государственного заказа по бюджетной программе 249 «Создание условий для развития животноводства и производства, переработки, реализации продукции животноводства» по подпрограммам 102 «Мониторинг, референция, лабораторная диагностика в ветеринарии» согласно договора с уполномоченным органом Комитет ветеринарного контроля и надзора Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан.

## **ЛИТЕРАТУРА**

1. Shandomy A.E., Raizman E., Bruni M., Palamara E., Pittiglio C., Lubroth J. Anthrax outbreaks: a warning for improved prevention, control and heightened awareness // 2016. - P. 37. <https://www.fao.org/3/i6124e/i6124e.pdf>.
2. Goel A. K. Anthrax: A disease of biowarfare and public health importance // World Journal of Clinical Cases: WJCC.- 2015. - Vol. 3, № 1. - P. 20.
3. Beyer W., and P.C.B. Turnbull. Anthrax in animals // Molecular aspects of medicine. - 2009. - Vol. 30, № 6. - P. 481-489.
4. Hanczaruk M., Reischl U., Holzmann T., Frangoulidis D., Wagner D.M., Keim P.S., Antwerpen M.H., Meyer H., Grass G. Injectional anthrax in heroin users, Europe, 2000-2012 // Emerg. Infect. Dis. - 2014. - Vol. 20., №2. - P. 322-323. <https://doi:10.3201/eid2002.120921>
5. Hugh-Jones M., Blackburn J. The ecology of Bacillus anthracis // Mol. Aspects. Med. - 2009. - Vol. 30. -№6. - P. 356-367.
6. Kanankege K. S., Abdrakhmanov S. K., Alvarez J., Glaser L., Bender J. B., Mukhanbetkaliyev Y. Y., Perez A. M. Comparison of spatiotemporal patterns of historic natural Anthrax outbreaks in Minnesota and Kazakhstan // PLoS one. - 2019. - Vol.14, №5. - e0217144.
7. Aminu O. R., Lembo T., Zadoks R. N., Biek R., Lewis S., Kiwelu I., Forde T. L. Practical and effective diagnosis of animal anthrax in endemic low-resource settings // PLoS neglected tropical diseases. - 2020. - Vol. 14, №9. – e0008655.
8. Van Ert M. N., Easterday W. R., Huynh L. Y., Okinaka R. T., Hugh-Jones M. E., Ravel J., Zanecki S. R., Pearson T., Simonson T. S., U'Ren J. M., Kachur S. M., Leadem-Dougherty R. R., Rhoton S. D., Zinser G., Farlow J., Coker P. R., Smith K. L., Wang B., Kenefic L. J., Fraser-Liggett C. M., Wagner D. M., Keim P. Global genetic population structure of Bacillus anthracis // PLoS One. - 2007. - Vol. 2. - № 5. <https://doi: 10.1371/journal.pone.0000461>.



9. Keim P., Kalif A., Schupp J., Hill K., Travis S. E., Richmond K., Jackson P. Molecular evolution and diversity in *Bacillus anthracis* as detected by amplified fragment length polymorphism markers // *Journal of bacteriology*. - 1997. – Vol. 179, №3. -P. 818-824.
10. Keim P., Price L. B., Klevytska A. M., Smith K. L., Schupp J. M., Okinaka R., Jackson P. J., Hugh-Jones M. E. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis* // *J. Bacteriol.* - 2000. - Vol. 182, № 10. - P.2928-2936.
11. Gierczynski R., Kałuzewski S., Rakin A., Jagielski M., Zasada A., Jakubczak A., Borkowska-Opacka B., Rastawicki W. Intriguing diversity of *Bacillus anthracis* in eastern Poland - the molecular echoes of the past outbreaks // *FEMS Microbiol. Lett.* - 2004. - Vol. 239, № 2. - P. 235-240.
12. Durmaz R., Doganay M., Sahin M., Percin D., Karahocagil M. K., Kayabas U., Otlu B., Karagoz A., Buyuk F., Celebi O., Ozturk Z., Ertek M. Molecular epidemiology of the *Bacillus anthracis* isolates collected throughout Turkey from 1983 to 2011. Anthrax Study Group // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* -2012. - Vol. 31, №10.- P. 2783-2790.
13. Le Fleche P., Hauck Y., Onteniente L., Prieur A., Denoed F., Ramiisse V., Sylvestre P., Benson G., Ramiisse F., Vergnaud G.A. Tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis* // *BMC Microbiol.* -2001. - Vol. 1. - P. 2.
14. Lista F., Faggioni G., Valjevac S., Ciammaruconi A., Vaissaire J. Genotyping of *Bacillus anthracis* strains based on automated capillary 25-loci multiple locus variable-number tandem repeats analysis // *BMC Microbiol.* - 2006. - Vol. 6. - P. 33.
15. Rondinone V., Galante D., Donatiello A., Serrecchia L., Manzulli V., Cipolletta D., Fasanella A. Phylogenetic study of the *Bacillus anthracis* strains isolated from Italian outbreaks by analyzing Canonical SNPs and MLVA at 31 loci // *Società Italiana di Diagnostica di Laboratorio Veterinaria*. - 2018. – P. 52-53.
16. Yu D., He J., Zhang E., Wang P., Liu D., Hou Y., Wei, J. Investigation and source-tracing of an anthrax outbreak in Gansu Province, China // *PloS one*.- 2018. - Vol.13, № 8. – e0203267.
17. Shevtsov A.B., Lutsay V.B., Kairzhanova A.D., Lukhnova L.Y., Kulatay T.Z., Izbanova U.A., Karibaev T.B., Shustov, A.V. Optimization of genotyping protocol for *B. anthracis* using multiple-locus VNTR analysis MLVA-31 // *Eurasian j. appl. biotechnol.* - 2019. - №2. - P. 103-113.
18. Beyer W., Bellan S., Eberle G., Ganz H.H., Getz W.M., Haumacher R., Hilss K.A., Kilian W., Lazak J., Turner W.C., Turnbull P.C. Distribution and molecular evolution of *Bacillus anthracis* genotypes in Namibia // *PLoS Negl. Trop. Dis.* - 2012. - Vol. 6. - e1534.
19. 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. 9. - e95131.
20. Muller J., Mohammad I., Warner S., Paskin R., Constable F., Fegan M. Genetic Diversity of Australian *Bacillus anthracis* Isolates Revealed by Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis // *Microorganisms*. - 2020. - Vol.8, № 6. - P.886.
21. Le Flèche P., Jacques I., Grayon M., Al Dahouk S., Bouchon P., Denoed F., Nöckler K., Neubauer H., Guilloteau L.A., Vergnaud G. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay // *BMC Microbiol.* - 2006. - Vol.6, №9. [https://doi: 10.1186/1471-2180-6-9](https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-9).

22. Antwerpen M., Ilin D., Georgieva E., Meyer H., Savov E., Frangoulidis D. MLVA and SNP analysis identified a unique genetic cluster in Bulgarian Bacillus anthracis strains // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. - 2011. - Vol. 30. - P. 923-930. [https://doi: 10.1007/s10096-011-1177-2](https://doi.org/10.1007/s10096-011-1177-2).

23. Pullan S.T., Pearson T.R., Latham J., Mason J., Atkinson B., Silman N.J., Marston C.K., Sahl J.W., Birdsell D., Hoffmaster A.R., et al. Whole-genome sequencing investigation of animal-skin-drum-associated UK anthrax cases reveals evidence of mixed populations and relatedness to a US case // Microb. Genom. - 2015. - Vol. 1. - e000039. [https://doi: 10.1099/mgen.0.000039](https://doi.org/10.1099/mgen.0.000039).

24. Vergnaud G., Girault G., Thierry S., Pourcel C., Madani N., Blouin Y. Comparison of French and worldwide Bacillus anthracis strains favors a recent, post-Columbian origin of the predominant North-American clade // PLoS ONE. - 2016. - Vol. 11. - e0146216. [https://doi: 10.1371/journal.pone.0146216](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146216).

25. Eremenko E., Pechkovskii G., Pisarenko S., Ryazanova A., Kovalev D., Semenova O. G., Kulichenko A. Phylogenetics of Bacillus anthracis isolates from Russia and bordering countries // Infection, Genetics and Evolution. - 2021. - Vol. 92. - e104890.

26. Simonson T. S., Okinaka R. T., Wang B., Easterday W. R., Huynh L., U'Ren J. M., Keim, P. Bacillus anthracis in China and its relationship to worldwide lineages // BMC microbiology. - 2009. - Vol. 9, №1. - P. 1-11.

## REFERENCES

1. Shandomy A.E., Raizman E., Bruni M., Palamara E., Pittiglio C., Lubroth J. Anthrax outbreaks: a warning for improved prevention, control and heightened awareness, 2016, pp. 37.

2. Goel A. K. Anthrax: A disease of biowarfare and public health importance. *World Journal of Clinical Cases: WJCC.*, 2015, vol. 3(1), pp. 20.

3. Beyer W., and P.C.B. Turnbull. Anthrax in animals. *Molecular aspects of medicine.* 2009, vol. 30.6, pp. 481-489.

4. Hanczaruk M., Reischl U., Holzmann T., Frangoulidis D., Wagner D.M., Keim P.S., Antwerpen M.H., Meyer H., Grass G. Injectional anthrax in heroin users, Europe, 2000-2012. *Emerg. Infect. Dis.*, 2014, vol. 20, no.2, pp. 322-323. [doi:10.3201/eid2002.120921](https://doi.org/10.3201/eid2002.120921)

5. Hugh-Jones M., Blackburn J. The ecology of Bacillus anthracis. *Mol. Aspects. Med.*, 2009, vol. 30, no 6, pp. 356-367.

6. Kanankege K. S., Abdrakhmanov S. K., Alvarez J., Glaser L., Bender J. B., Mukhanbetkaliyev Y. Y., Perez A. M. Comparison of spatiotemporal patterns of historic natural Anthrax outbreaks in Minnesota and Kazakhstan. *PLoS one.*, 2019, vol.14(5), e0217144.

7. Aminu O. R., Lembo T., Zadoks R. N., Biek R., Lewis S., Kiwelu I., Forde T. L. Practical and effective diagnosis of animal anthrax in endemic low-resource settings. *PLoS neglected tropical diseases.*, 2020, vol. 14(9), e0008655.

8. Van Ert M. N., Easterday W. R., Huynh L. Y., Okinaka R. T., Hugh-Jones M. E., Ravel J., Zanecki S. R., Pearson T., Simonson T. S., U'Ren J. M., Kachur S. M., Leadem-Dougherty R. R., Rhoton S. D., Zinser G., Farlow J., Coker P. R., Smith K. L., Wang B., Kenefic L. J., Fraser-Liggett C. M., Wagner D. M., Keim P. Global genetic population structure of Bacillus anthracis. *PLoS One.* 2007, vol. 2, no. 5. [doi: 10.1371/journal.pone.0000461](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000461).

9. Keim P., Kalif A., Schupp J., Hill K., Travis S. E., Richmond K., Jackson P. Molecular evolution and diversity in Bacillus anthracis as detected by amplified

fragment length polymorphism markers. *Journal of bacteriology*. 1997, vol. 179, no.3, pp. 818-824.

10. Keim P., Price L. B., Klevytska A. M., Smith K. L., Schupp J. M., Okinaka R., Jackson P. J., Hugh-Jones M. E. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis* // *J. Bacteriol.* – 2000. – Vol. 182. – № 10. – P.2928-2936.

11. Gierczynski R., Kałuzewski S., Rakin A., Jagielski M., Zasada A., Jakubczak A., Borkowska-Opacka B., Rastawicki W. Intriguing diversity of *Bacillus anthracis* in eastern Poland - the molecular echoes of the past outbreaks. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2004, vol. 239, no 2, pp. 235-240.

12. Durmaz R., Doganay M., Sahin M., Percin D., Karahocagil M. K., Kayabas U., Otlu B., Karagoz A., Buyuk F., Celebi O., Ozturk Z., Ertek M. Molecular epidemiology of the *Bacillus anthracis* isolates collected throughout Turkey from 1983 to 2011. Anthrax Study Group. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2012, vol. 31, no 10, pp. 2783-2790.

13. Le Fleche P., Hauck Y., Onteniente L., Prieur A., Denoeud F., Ramiise V., Sylvestre P., Benson G., Ramiise F., Vergnaud G.A. Tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. *BMC Microbiol.*, 2001, vol. 1, pp. 2.

14. Lista F., Faggioni G., Valjevac S., Ciammaruconi A., Vaissaire J. Genotyping of *Bacillus anthracis* strains based on automated capillary 25-loci multiple locus variable-number tandem repeats analysis. *BMC Microbiol.*, 2006, vol. 6, pp. 33.

15. Rondinone V., Galante D., Donatiello A., Serrecchia L., Manzulli V., Cipolletta D., Fasanella A. Phylogenetic study of the *Bacillus anthracis* strains isolated from Italian outbreaks by analyzing Canonical SNPs and MLVA at 31 loci. *Società Italiana di Diagnostica di Laboratorio Veterinaria*. 2018, pp. 52-53.

16. Yu D., He J., Zhang E., Wang P., Liu D., Hou Y., Wei, J. Investigation and source-tracing of an anthrax outbreak in Gansu Province, China. *PloS one*. 2018, vol.13(8), e0203267.

17. Shevtsov A.B., Lutsay V.B., Kairzhanova A.D., Lukhnova L.Y., Kulatay T.Z., Izbanova U.A., Karibaev T.B., Shustov, A.V. Optimization of genotyping protocol for *B. anthracis* using multiple-locus VNTR analysis MLVA-31. *Eurasian j. appl. biotechnol.*, 2019, no 2, pp. 103-113.

18. Beyer W., Bellan S., Eberle G., Ganz H.H., Getz W.M., Haumacher R., Hilss K.A., Kilian W., Lazak J., Turner W.C., Turnbull P.C. Distribution and molecular evolution of *Bacillus anthracis* genotypes in Namibia. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2012, vol. 6, e1534.

19. 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. 9, e95131.

20. Muller J., Mohammad I., Warner S., Paskin R., Constable F., Fegan M. Genetic Diversity of Australian *Bacillus anthracis* Isolates Revealed by Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis. *Microorganisms*. 2020, vol.8(6), pp.886.

21. Le Flèche P., Jacques I., Grayon M., Al Dahouk S., Bouchon P., Denoeud F., Nöckler K., Neubauer H., Guilloteau L.A., Vergnaud G. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiology*. 2006, vol.6:9. doi: 10.1186/1471-2180-6-9.

22. Antwerpen M., Ilin D., Georgieva E., Meyer H., Savov E., Frangoulidis D. MLVA and SNP analysis identified a unique genetic cluster in Bulgarian *Bacillus anthracis* strains. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2011, vol. 30, pp. 923-930. doi: 10.1007/s10096-011-1177-2.



23. Pullan S.T., Pearson T.R., Latham J., Mason J., Atkinson B., Silman N.J., Marston C.K., Sahl J.W., Birdsell D., Hoffmaster A.R., et al. Whole-genome sequencing investigation of animal-skin-drum-associated UK anthrax cases reveals evidence of mixed populations and relatedness to a US case. *Microb. Genom.*, 2015, vol. 1, e000039. doi: 10.1099/mgen.0.000039.

24. Vergnaud G., Girault G., Thierry S., Pourcel C., Madani N., Blouin Y. Comparison of French and worldwide *Bacillus anthracis* strains favors a recent, post-Columbian origin of the predominant North-American clade. *PLoS ONE*, 2016, vol. 11, e0146216. doi: 10.1371/journal.pone.0146216.

25. Eremenko E., Pechkovskii G., Pisarenko S., Ryazanova A., Kovalev D., Semenova O. G., Kulichenko A. Phylogenetics of *Bacillus anthracis* isolates from Russia and bordering countries. *Infection, Genetics and Evolution.*, 2021, vol. 92, e104890.

26. Simonson T. S., Okinaka R. T., Wang B., Easterday W. R., Huynh L., U'Ren J. M., Keim, P. *Bacillus anthracis* in China and its relationship to worldwide lineages. *BMC Microbiology*, 2009, vol. 9, no.1, pp. 1-11.

## ӨКІЛДІК ШТАММДАР КОЛЛЕКЦИЯСЫН ҚҰРУ КЕЗІНДЕГІ

### *B. ANTHRACIS*-ТІ MLVA ГЕНОТИПТИУ

\* Кәрібаев Т.Б., Бердіқұлов М.А., Құспеков Р.Н., Тегжанов А.Ғ., Тоқаева Д.А.,  
Ташкенбаев А.С., Біржанов Т.Б., Айтжанов Ж.Ж., Жұмахмет Н.М.,  
Испуллаев Н., Қожахметова Т.Е., Сураганова Ф.Е.

*Ветеринария бойынша ұлттық референттік орталық*

*Абайыдың 150-жылдығына көшесі, 22/3 үй, Нұр-Сұлтан, 010000, Қазақстан*

\* *karibaev.v7@mail.ru*

## ТҮЙІН

Сібір жарасы – сүтқоректілердің және адамдардың көптеген түрлерін зақымдайтын жұқпалы ауру. Патогенді бактериологиялық жолмен бөліп алу және оны фенотиптік және ПТР әдістерімен анықтау алтын стандарт болып қала береді. Дегенмен, бұл әдістер аурудың себебін анықтауға мүмкіндік бермейді, атап айтқанда олардың бір немесе бірнеше көздерден шығуын. Сонымен қатар, ерекше қауіпті инфекциялардың қоздырғыштары Ұлттық коллекцияларда сақталады және бірегей қасиеттері бар штаммдардың жоғалуын, сондай-ақ бірдей штаммдардың сақталуын болдырмаудың алғышарты бір репрезентативті штамм таңдай отырып генотиптеу болып табылады. Бұл зерттеуде біз 2021 жылы жануарлардағы сібір жарасының 5 ошағынан бөлініп алынған 10 изоляттың MLVA генотипін анықтадық. Алынған MLVA профильдер әртүрлі ошақтардағы изоляттарды дифференциациялауға мүмкіндік берді және әрбір ошақтағы генотиптердің сәйкестігін растады. Коллекцияны толықтыру үшін бірегей



штамдарды генотиптеу және таңдаудың негізгі әдісі ретінде *B. anthracis* MLVA генотипін ұсынуға болады.

Негізгі сөздер: сибір жарасы, изолят, MLVA, генотиптеу, *B. anthracis*, ПТР.

## MLVA GENOTYPING OF *B. ANTHRACIS* IN THE FORMATION OF A COLLECTION OF REPRESENTATIVE STRAINS

\*Karibaev T.B., Berdikulov M.A., Kuspekov R.N., Tegzhanov A.G., Tokaeva D.A.,  
Tashkenbaev A.S., Birzhanov T.B., Aitzhanov Zh.Zh., Zhumakhmet N M.,  
Ispullaev N., Kozhakhmetova T.E., Suraganova F.E.

*National Reference Center for Veterinary Medicine*

*22/3, 150 let Abaya str., Nur- Sultan, 010000, Kazakhstan*

*\*karibaev.v7@mail.ru*

### ABSTRACT

Anthrax is an infectious disease that affects many species of mammals and humans. Bacteriological isolation of the pathogen and its identification by phenotypic and PCR methods remains the gold standard. However, these methods do not allow determining the cause of the outbreak, namely, their origin from one or more sources. In addition, the causative agents of especially dangerous infections are deposited in the National Collections, and genotyping with the selection of a single representative strain is a prerequisite to prevent the loss of strains with unique properties, as well as the deposition of identical strains. In this study, we performed MLVA genotyping of 10 isolates from 5 outbreaks of anthrax in animals in 2021. The obtained MLVA profiles allowed differentiation of isolates in different outbreaks and confirmed the identity of genotypes in each outbreak. MLVA genotyping of *B. anthracis* can be recommended as the primary method for genotyping and selection of unique strains for replenishment of the collection.

**Keywords:** anthrax, isolate, MLVA, genotyping, *B. anthracis*, PCR.