

# Использование гена, кодирующего белок GamR, в качестве видоспецифического хромосомного маркера для дифференциации *B. anthracis* от близкородственных видов

В.С.Тимофеев, В.В.Каптелова, И.В.Бахтеева, Р.И.Миронова,  
Г.М.Титарева, Ю.О.Гончарова, Л.И.Маринин, А.Н.Мокриевич

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора,  
Оболенск, Московская область, Российская Федерация

Одним из методов дифференциации *B. anthracis* от других близкородственных микроорганизмов является его чувствительность к специфическому бактериофагу  $\gamma$  (Гамма). Davison и соавт. установили, что рецептором для фага Гамма является белок BA3367, названный GamR. Целью данного исследования являлась оценка возможности использования гена, кодирующего белок BA3367, в качестве видоспецифического хромосомного маркера для ПЦР-дифференциации *B. anthracis* от близкородственных бацилл. Применив анализ *in silico*, мы выявили у *B. anthracis* трехнуклеотидную инсерцию 97AAG101, которую использовали для дизайна видоспецифических праймеров и Taq-man зонда. Особенностью праймеров было, во-первых, использование инсерции в качестве трех 3'-концевых нуклеотидов прямого праймера и, во-вторых, введение искусственной некомплементарной замены G→C в -4 положении с 3'-конца прямого праймера для повышения специфичности реакции. Сконструированные праймеры и Taq-man зонд показали 100%-ную видоспецифичность в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с отсутствием ложных результатов. Мы считаем, что ген, кодирующий белок GamR, является перспективным в качестве видоспецифического хромосомного маркера *B. anthracis* как при отдельном использовании, так и для применения в мультиплексных ПЦР-тест-системах для идентификации сибиреязвенного микроба и дифференциации его от близкородственных бацилл.

**Ключевые слова:** *B. anthracis*, ПЦР-дифференциация, бактериофаг  $\gamma$

**Для цитирования:** Тимофеев В.С., Каптелова В.В., Бахтеева И.В., Миронова Р.И., Титарева Г.М., Гончарова Ю.О., Маринин Л.И., Мокриевич А.Н. Использование гена, кодирующего белок GamR, в качестве видоспецифического хромосомного маркера для дифференциации *B. anthracis* от близкородственных видов. Бактериология. 2018; 3(3): 22–27. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-3-22-27

## Using the gen encoding GamR protein as a species-specific chromosomal marker to differentiate *B. anthracis* from closely related species

V.S.Timofeev, V.V.Kaptelova, I.V.Bakhteeva, R.I.Mironova,  
G.M.Titareva, Yu.O.Goncharova, L.I.Marinin, A.N.Mokrievich

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

A method differentiating *B. anthracis* from other closely related microorganisms relies upon its  $\gamma$  phage susceptibility. Davison et al. have found the protein BA3367 designated GamR to be a receptor for the phage. The objective of the research was to evaluate the gene encoding BA3367 as a species-specific chromosomal marker in PCR-based differentiating *B. anthracis* from closely related bacilli. Applying the analysis *in silico* we identified a *B. anthracis* three-nucleotide insert 97AAG101 to use it then in designing species-specific primers and Taq-man probe. The primers featured by their (i) using the insert as three 3'-terminal nucleotides of the forward primer and (ii) artificial non-complementary substitution G→C in position -4 from the 3'-end of the forward primer to improve the reaction specificity. The primers and Taq-man probe were 100% species-specific in PCR without false positive results. We believe that the gen encoding the protein GamR is a candidate for a species-specific chromosomal marker for *B. anthracis*, when both applied alone and integrated into multiplex PCR test-systems to identify the anthrax microbe and to differentiate it from closely related bacilli.

**Keywords:** *B. anthracis*, PCR differentiation, bacteriophage  $\gamma$

**For citation:** Timofeev V.S., Kaptelova V.V., Bakhteeva I.V., Mironova R.I., Titareva G.M., Goncharova Yu.O., Marinin L.I., Mokrievich A.N. Using the gen encoding GamR protein as a species-specific chromosomal marker to differentiate *B. anthracis* from closely related species. Bacteriology. 2018; 3(3): 22–27. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-3-22-27

### Для корреспонденции:

Тимофеев Виталий Сергеевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ

Телефон: (4967) 36-0003

E-mail: timofeev@obolensk.org

Статья поступила 17.06.2018 г., принята к печати 29.10.2018 г.

### For correspondence:

Vitaliy S. Timofeev, PhD (Biol), Leading Researcher of the Laboratory of Anthrax Microbiology of the Department of Highly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation

Phone: (4967) 36-0003

E-mail: timofeev@obolensk.org

The article was received 17.06.2018, accepted for publication 29.10.2018

**С**ибирская язва – острое инфекционное заболевание, поражающее главным образом домашних и диких жвачных животных, а также людей. Несмотря на то что это заболевание представляет собой значительную проблему преимущественно в субсахарской Африке и в некоторых регионах Азии [1–3] и весьма редко встречается в большинстве европейских стран [4], две вспышки инфекции в России [3] и Швеции [5], произошедшие в 2016 г., наглядно демонстрируют, что даже в регионах, где это заболевание не фиксировалось десятилетиями, возможны его вспышки, приводящие к значительному экономическому ущербу, массовому падежу сельскохозяйственных животных и человеческим жертвам.

Этиологическим агентом сибирской язвы является грамположительная спорообразующая бактерия *Bacillus anthracis*. В связи с высокой вирулентностью *B. anthracis*, стабильностью эндоспор в окружающей среде и легкостью культивирования эту бактерию относят к биологическим агентам, которые могут использоваться в качестве биологического оружия или инструмента биотерроризма [6, 7]. В таксономическом отношении *B. anthracis* является членом группы *Bacillus cereus sensu lato*, включающей также виды *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis*, вызывающих инфекции млекопитающих. Степень генетического родства между этими видами столь высока, что есть основания считать их фенотипическими вариантами одного вида [8]. Но при этом высокая патогенность присуща только виду *B. anthracis*, что и обуславливает актуальность разработки систем быстрой и надежной его индикации и дифференциации от близкородственных видов. Традиционные культуральные и микробиологические методы исследования достаточно трудоемки и занимают длительное время. Значительно ускорить процесс индикации сибиреязвенного микроба в исследуемом материале можно, используя современные молекулярно-биологические методы, в частности ПЦР.

Наиболее значимой генетической особенностью *B. anthracis* является наличие двух плазмид – рХО1 и рХО2, на которых расположены гены синтеза факторов патогенности сибиреязвенного микроба – трехкомпонентного токсина и поли-D-глутаминовой капсулы соответственно. Именно эти гены в большинстве случаев используются в качестве мишеней.

Однако в последние десятилетия были обнаружены штаммы *B. cereus*, обладающие рХО-подобными плазмидами, а также гомологами генов плазмиды рХО2 в гетерологичных плазмидах, что не только запутывает филогенетическую структуру группы *B. cereus sensu lato*, но также усложняет индикацию *B. anthracis*. Также описаны изоляты *B. anthracis*, лишенные плазмид [9–14], что может приводить к ложноположительным и ложноотрицательным результатам ПЦР-тестов, основанных на плазмидных маркерах. Очевидным решением проблемы индикации штаммов сибиреязвенного микроба с неполным плазмидным профилем, а также дифференциации «типичных» штаммов *B. anthracis* от близкородственных микроорганизмов, обладающих рХО-подобными плазмидами, является использование ПЦР-мишеней, локализованных на хромосоме. В ряде исследований было показано, что наиболее специфичными хромосомными генами являются локусы BA5345 [5, 15], PL3 [16] и BA5357 [17].

В то же время, по данным литературы, до сих пор не проводились попытки использовать в качестве ПЦР-мишеней генетические детерминанты, потенциально обуславливающие диагностически значимые фенотипические отличия *B. anthracis* от близкородственных видов. Использование этих детерминант в качестве ПЦР-мишеней может не только обеспечить дифференциацию *B. anthracis* и несибиреязвенных штаммов, но и позволить предсказать наличие тех или иных фенотипических свойств по результатам ПЦР без исследования культуральных и биохимических свойств.

Одним из методов дифференциации *B. anthracis* от других близкородственных микроорганизмов является чувствительность к фагу  $\gamma$  (Гамма). Почти все изоляты *B. anthracis* чувствительны к этому фагу, в то время как большинство штаммов *B. cereus* и *B. thuringiensis* устойчивы к нему. Фаг Гамма был впервые описан в 1955 г. как вариант фага W [18, 19]. Видоспецифичность фага Гамма обусловила интерес исследователей к поиску причин такого избирательного действия. Наиболее очевидной причиной, которую можно предположить, является наличие у *B. anthracis* видоспецифического рецептора для этого фага.

Первоначально существовали различные взгляды на химическую природу этого рецептора. Так, Lantos и Ivanovics, обнаружив [20], что связь с Гамма-фаговым рецептором была потеряна после обработки 5% трихлоруксусной кислотой при температуре 90°C, а затем трипсином, сделали вывод о том, что он, по всей видимости, является белком. Watanabe и Shiomi предположили, что это одно вещество или комбинация следующих веществ: диаминопимелиновая кислота (мезо-ДАПК), D-глюкозамин, D-галактозамин, D-маннозамин, составляющих пептидогликан или связанные с ним полисахариды, и L-лизина. Белковая природа рецептора была поставлена под сомнение, так как после обработки растворителями не наблюдалось потери способности к связыванию фага [21, 22]. Тем не менее используемая ими обработка позволяет инактивировать лишь мембранные белки, но не белки пептидогликана, неизвестные в то время.

Таким образом, были получены данные, позволяющие предположить, что Гамма-фаговый рецептор, по всей видимости, является белком, ассоциированным с пептидогликановым слоем. Этот белок удалось идентифицировать лишь после секвенирования и аннотации геномов сибиреязвенного микроба. Davison и соавт. установили, что рецептором для фага Гамма является белок BA3367, содержащий LPXTG-мотив, который с помощью сортазы A (SrtA) ковалентно связан с пептидными компонентами пептидогликанового слоя клеточной стенки [23]. Данный белок был назван GamR (Гамма phage receptor).

Целью данного исследования являлась оценка возможности использования гена, кодирующего рецептор к фагу Гамма, в качестве видоспецифического хромосомного маркера для дифференциации *B. anthracis* от близкородственных видов.

## Материалы и методы

**Штаммы микроорганизмов.** В работе использовали 130 штаммов *B. anthracis* и 20 штаммов близкородственных

бацилл (*B. subtilis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*) из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск» ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии».

**Среды и условия культивирования.** Используемые штаммы выращивали на плотной питательной среде LB Broth, Miller (Luria-Bertani) (Amresco, США).

**Чувствительность к диагностическому фагу Гамма.** Для определения чувствительности к диагностическому фагу «Гамма А-26» (СтавНИИПЧИ, Россия) в центр чашки с микробной культурой наносили каплю бактериофага. Результаты учитывали визуально через 24 ч культивирования при температуре 37°C. При положительном результате на месте нанесения бактериофага наблюдали полное или частичное отсутствие роста исследуемой культуры.

**Анализ *in silico*.** С помощью анализа *in silico* были проанализированы нуклеотидные и аминокислотные последовательности 133 штаммов *B. anthracis* и близкородственных бацилл, доступных на информационном портале NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Поиск аналогов целевых генов проводился с помощью алгоритма BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей, дизайн олигонуклеотидных праймеров и зондов, расчет их температур плавления, трансляция *in silico*, анализ расположения на хромосоме исследуемых генов и их гомологов, а также их фрагментов проводили с помощью пакета программ Vector NTI 10.0.1. (Invitrogen Corporation), филогенетический анализ проводили с помощью программы MEGA 7.0 (<http://www.megasoftware.net>).

**Выделение нуклеиновых кислот.** Препараты тотальной ДНК из бактериальных клеток получали с помощью набора реагентов GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kits (Sigma-Aldrich, США). Все манипуляции проводили согласно инструкциям производителя.

**Полимеразная цепная реакция.** ПЦР проводили с помощью амплификатора с оптическим ПЦР-модулем CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA) с использованием «2,5-кратной реакционной смеси для проведения ПЦР-ПВ в присутствии красителя SYBRGreenI» и «2,5-кратной реакционной смеси для проведения ПЦР-ПВ» (Синтол, Россия, Москва). Детекцию продуктов амплификации проводили с использованием оптического ПЦР-модуля по каналам FAM/SYBR.

При необходимости продукты реакции разделяли электрофорезом в 0,7–1,8% агарозном геле («Sigma» США) в ТАЕ-буфере (Трис-ацетат 0,04 М, ЭДТА 0,002 М, pH 8,0), с последующим окрашиванием бромистым этидием (100 мг/л) и детекцией с использованием трансиллюминатора ECX-15.L при длине волны 365 нм (VilberLourmat, Франция).

Олигонуклеотидные праймеры и зонды, используемые в данной работе, были синтезированы ЗАО «Синтол» (г. Москва, Россия).

При проведении ПЦР использовался следующий режим амплификации:

95°C – 180 с – преинкубация,

95°C – 30 с, 60°C – 30 с, 72°C – 30 с – 45 циклов.

## Результаты и обсуждение

Был проведен анализ *in silico* последовательностей гена, кодирующего белок ВА3367 и его гомологи в геномах сибиреязвенного микроба и близкородственных микроорганизмов, аннотированных в GeneBank. Множественное выравнивание этих последовательностей позволило выявить у всех проанализированных штаммов *B. anthracis* трехнуклеотидную инсерцию 97AAG101 (рисунок). Благодаря этой особенности при трансляции *in silico* белок ВА3367 получает в своей последовательности дополнительный остаток глутаминовой кислоты в 33 положении, при этом рамка считывания сохраняется.

Мы разработали пару праймеров, которая позволила нам успешно определять инсерцию в гене *GamR*. В ней прямой праймер имел три 3'-концевых нуклеотида, комплементарных специфичной для *B. anthracis* инсерции. Кроме того, специфичность реакции была повышена за счет включения в последовательность прямого праймера дополнительной точечной дестабилизирующей замены основания на некомплементарное G→C в (-4) положении с 3' конца форвардного праймера. Такой методический подход обеспечивает успешную амплификацию ДНК *B. anthracis* и гарантированное отсутствие амплификации фрагмента ДНК несибиреязвенных бацилл из-за некомплементарности сразу четырех концевых нуклеотидов прямого праймера и невозможности гибридизации [24]. Обратный праймер был комплементарен региону, не имеющему видоспецифических отличий, специфичность ПЦР-реакции при этом достигается только за счет прямого праймера.

Последовательность прямого праймера: 5'GCGAATACAGTACATATTACGTTTGCTGAACAAG3',

последовательность обратного праймера: 5'ACAAAGCGGAAAACAACAACATCTCCAG3'.

Первичная проверка специфичности синтезированных праймеров осуществлялась на панели из 150 штаммов *B. anthracis* и близкородственных бацилл с использованием набора «2,5-кратной реакционной смеси для проведения ПЦР-ПВ в присутствии красителя SYBR Green I» (Синтол, Россия, Москва). Детекция осуществлялась по каналу SYBR/FAM.

Полученные результаты показали, что все исследованные штаммы *B. anthracis* дали положительную реакцию с данными праймерами. Однако ПЦР-положительными оказались три штамма *B. thuringiensis*: g7566, 214, 1373. В то же время при постановке реакции на чувствительность к Гамма-фагу эти штаммы оказались к нему нечувствительными. Подобные факты были описаны ранее. Например, в работе [23] указывается, что штамм *B. thuringiensis* 97-27 не лизируется фагом Гамма, но при этом, по данным электронной микроскопии, фаговые частицы адсорбируются на поверхности бактериальных клеток. Отсутствие лизиса в этом случае может быть объяснено различиями в последовательности других бактериальных белков, необходимых для взаимодействия бактерия-фаг, и/или мишеней фаговых белков, например, лизина PlyG, способного лизировать клетки *B. anthracis*, но не *B. cereus* или *B. thuringiensis*. Известно, что использование единичных хромосомных маркеров не гарантирует абсолютную достоверность результатов. Например, при ис-

Использование гена, кодирующего белок GamR, в качестве видоспецифического хромосомного маркера для дифференциации *B. anthracis* от близкородственных видов



Рисунок. Фрагмент множественного выравнивания последовательностей гена *BA3367*. Выделенный рамкой фрагмент содержит видоспецифическую для *B. anthracis* трехнуклеотидную инсерцию.

следовании крупной выборки штаммов из группы *B. cereus sensu lato* [25], было установлено, что почти треть геномов сформированы в результате горизонтального переноса генов, происходящего в рамках всей группы в целом, без ограничения видовой принадлежностью. Тем самым было продемонстрировано, что горизонтальный перенос генов значительно искажает эволюционную историю всей группы видов, ограничивая значимость отдельных генетических маркеров. Более того, авторы считают, что для всей группы *B. cereus sensu lato* характерна так называемая «сетевая эволюция», заключающаяся в возникновении новой филогенетической единицы путем слияния двух или более предковых форм, что графически лучше отражается в виде сети, а не традиционно используемого бифуркационного дерева. В диагностике следствием указанных фактов является достаточно заметный процент ложноположительных и ложноотрицательных результатов при дифференциации *B. anthracis* от близкородственных бацилл. Поэтому наиболее очевидным путем повышения достоверности ПЦР-тестов является разработка мультиплексных ПЦР-тест-систем, использующих одновременно несколько видоспецифических маркеров, что позволит свести вероятность ложноположительных и ложноотрицательных результатов при ПЦР-индикации *B. anthracis* до пренебрежимо малых величин.

Для повышения специфичности анализа и оценки перспективности использования гена *gamR* как мишени в муль-

типлексных ПЦР-тест системах нами был сконструирован флуоресцентно меченный Taq-map зонд (AGCCCCGGCCATT AAGCCATCAATG, FAM), после чего была проведена повторная проверка специфичности синтезированных праймеров совместно с зондом на той же панели из 150 штаммов *B. anthracis* и близкородственных бацилл по каналу SYBR/FAM. Полученные результаты продемонстрировали положительную ПЦР у всех 130 штаммов *B. anthracis* и отрицательную реакцию у всех двадцати штаммов близкородственных бацилл. Таким образом, использование Taq-map зонда позволило полностью исключить ложноположительные результаты.

### Заключение

Анализ *in silico* последовательностей гена, кодирующего белок GamR (BA3367), позволил выявить у *B. anthracis* трехнуклеотидную инсерцию 97AAG101, использованную нами для дальнейшего дизайна видоспецифических праймеров. Особенностью дизайна было то, что в качестве прямого праймера использовали нуклеотид, комплементарный области ДНК рядом с инсерцией, причем три 3'-концевых нуклеотида были комплементарны инсерции в гене рецептора фага Гамма *B. anthracis*. Специфичность ПЦР увеличили введением искусственной некомплементарной замены G→C в (-4) положении с 3'-конца прямого праймера. Для дальней-

шего повышения специфичности реакции был сконструирован флуоресцентно меченный Taq-man зонд. Результатом использования данной пары праймеров совместно с Taq-man зондом стала 100%-ная видоспецифичность ПЦР с отсутствием ложных результатов. Таким образом, регион рецептора фага Гамма является перспективным в качестве видоспецифического хромосомного маркера *B. anthracis* как при отдельном использовании, так и для применения в мультиплексных ПЦР-тест-системах для идентификации сибиреязвенного микроба и дифференциации его от близкородственных видов бацилл.

В настоящее время техническое оснащение большинства отечественных клинико-диагностических и научно-исследовательских лабораторий позволяет проводить ПЦР с учетом результатов в реальном времени одновременно по нескольким оптическим каналам. Поэтому разработка мультиплексных ПЦР-тест-систем, использующих одновременно несколько видоспецифических маркеров, является одним из наиболее логичных путей повышения достоверности ПЦР-тестов. Этот подход позволяет значительно, практически до нуля, снизить вероятность ошибки диагностики и в то же время лишь незначительно увеличивает стоимость анализа.

*Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.*

## Литература/References

- Ardi P, Emanuele C, Luigina S, Leonardo M, et al. Genotyping of *Bacillus anthracis* strains circulating in Albania. *Journal of Bioterrorism & Biodefense*. 2015;7:1-6.
- Okello A, Welburn S, Smith J. Crossing institutional boundaries: mapping the policy process for improved control of endemic and neglected zoonoses in sub-Saharan Africa. *Health Policy Plan*. 2015 Jul;30(6):804-12. DOI: 10.1093/heapol/czu059.
- Попова АЮ, Демина ЮВ, Куличенко АН, Рязанова АН, и др. Эпидемиологические особенности вспышки сибирской язвы в ямало-ненецком автономном округе в 2016 году. Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных. 2017, с. 81-84. / Popova AYU, Demina YuV, Kulichenko AN, Ryazanova AN, et al. Epidemiologicheskie osobennosti vspyskhi sibirskoi yazyvu v yamalo-nenetskom avtonomnom okruge v 2016 godu. Aktual'nye problemy boleznei, obshchikh dlya cheloveka i zhivotnykh. 2017, s. 81-84. (In Russian).
- Turnbull PC. World Health Organization. Anthrax in humans and animals. In: (Editor) PT, editor. - Geneva (CH): WHO Press, 2008.
- Lewerin SS, Elvander M, Westermarck T, Hartzell LN, Norström AK, Ehrs S, et al. Anthrax outbreak in a Swedish beef cattle herd – 1st case in 27 years: Case report. *Acta Vet Scand*. 2010 Feb 1;52:7. DOI: 10.1186/1751-0147-52-7.
- Inglesby TV, O'Toole T, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, et al. Anthrax as a biological weapon, 2002: updated recommendations for management. *JAMA*. 2002 May 1;287(17):2236-52.
- Fowler RA, Shafazand S. Anthrax bioterrorism: prevention, diagnosis and management strategies. *JBioterr Biodef*. 2011;2:107.
- Zwick ME, Joseph SJ, Didelot X, Chen PE, Bishop-Lilly KA, Stewart AC, et al. Genomic characterization of the *Bacillus cereus sensu lato* species: Backdrop to the evolution of *Bacillus anthracis*. *Genome Res*. 2012 Aug;22(8):1512-24. DOI: 10.1101/gr.134437.111.
- Turnbull PC, Hutson RA, Ward MJ, Jones MN, Quinn CP, Finnie NJ, et al. *Bacillus anthracis* but not always anthrax. *J Appl Bacteriol*. 1992 Jan;72(1):21-8.
- Pannucci J, Okinaka RT, Sabin R, Kuske CR. *Bacillus anthracis* pXO1 plasmid sequence conservation among closely related bacterial species. *J Bacteriol*. 2002 Jan;184(1):134-41.
- Pannucci J, Okinaka RT, Williams E, Sabin R, Ticknor LO, Kuske CR. DNA sequence conservation between the *Bacillus anthracis* pXO2 plasmid and genomic sequence from closely related bacteria. *BMC Genomics*. 2002 Dec 9;3(1):34.
- Hoffmaster AR, Ravel J, Rasko DA, Chapman GD, Chute MD, Marston CK, et al. Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jun 1;101(22):8449-54. DOI: 10.1073/pnas.0402414101
- Klee SR, Brzuszkiewicz EB, Nattermann H, Brüggemann H, Dupke S, Wollherr A, et al. The genome of a *Bacillus* isolate causing anthrax in chimpanzees combines chromosomal properties of *B. cereus* with *B. anthracis* virulence plasmids. *PLoS One*. 2010 Jul 9;5(7):e10986. DOI: 10.1371/journal.pone.0010986.
- Klee SR, Ozel M, Appel B, Boesch C, Ellerbrok H, Jacob D, et al. Characterization of *Bacillus anthracis*-like bacteria isolated from wild great apes from Cote d'Ivoire and Cameroon. *J Bacteriol*. 2006 Aug;188(15):5333-44. DOI: 10.1128/JB.00303-06
- Antwerpen MH, Zimmermann P, Bewley K, Frangoulidis D, Meyer H. Real-time PCR system targeting a chromosomal marker specific for *Bacillus anthracis*. *Mol Cell Probes*. 2008 Oct-Dec;22(5-6):313-5. DOI: 10.1016/j.mcp.2008.06.001.
- Wielinga PR, Hamidjaja RA, Agren J, Knutsson R, Segerman B, Fricker M, et al. A multiplex real-time PCR for identifying and differentiating *B. anthracis* virulent types. *Int J Food Microbiol*. 2011 Mar 1;145 Suppl 1:S137-44. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.039.
- Létant SE, Murphy GA, Alfaro TM, Avila JR, Kane SR, Raber E, et al. Rapid-viability PCR method for detection of live, virulent *Bacillus anthracis* in environmental samples. *Appl Environ Microbiol*. 2011 Sep;77(18):6570-8. DOI: 10.1128/AEM.00623-11
- Brown ER, Cherry W. Specific identification of *Bacillus anthracis* by means of a variant bacteriophage. *J Infect Dis*. 1955 Jan-Feb;96(1):34-9.
- McCloy EW. Studies on a lysogenic *Bacillus* strain. I. A bacteriophage specific for *Bacillus anthracis*. *J Hyg (Lond)*. 1951 Mar;49(1):114-25.
- Lantos J, Ivanovics G. The phage receptors of *Bacillus anthracis*. *Acta Microbiol Acad Sci Hung*. 1961;8:379-88.
- Mesnager S, Fontaine T, Mignot T, Delepierre M, Mock M, Fouet A. Bacterial SLH domain proteins are non-covalently anchored to the cell surface via a conserved mechanism involving wall polysaccharide pyruvylation. *EMBO J*. 2000 Sep 1;19(17):4473-84. DOI: 10.1093/emboj/19.17.4473
- Watanabe T, Shiomi T. Inhibiting materials for gamma phage adsorption to the cell wall of *Bacillus anthracis*, strain Pasteur No. 2-H. *Jpn J Microbiol*. 1975 Apr; 19(2):115-21.
- Davison S, Couture-Tosi E, Candela T, Mock M, Fouet A. Identification of the *Bacillus anthracis* (gamma) phage receptor. *J Bacteriol*. 2005 Oct;187(19):6742-9. DOI: 10.1128/JB.187.19.6742-6749.2005
- Birdsell DN, Pearson T, Price EP, Hornstra HM, Nera RD, Stone N, et al. Melt Analysis of Mismatch Amplification Mutation Assays (Melt-MAMA): A Functional Study of a Cost-Effective SNP Genotyping Assay in Bacterial Models. *PLoS One*. 2012;7(3):e32866. DOI: 10.1371/journal.pone.0032866.
- Cardazzo B, Negrisolio E, Carraro L, Alberghini L, Patarnello T, Giaccone V. Multiple-Locus Sequence Typing and Analysis of Toxin Genes in *Bacillus cereus* Food-Borne Isolates. *Appl Environ Microbiol*. 2008 Feb;74(3):850-60. DOI: 10.1128/AEM.01495-07

### Информация об авторах:

Каптелова Валерия Владимировна, стажер-исследователь лаборатории микробиологии сибирской язвы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ГИИБ  
Телефон: (4967) 36-0003

Бахтеева Ирина Викторовна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0003

Миронова Раиса Ивановна, научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0003

Титарева Галина Михайловна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0003

Гончарова Юлия Олеговна, стажер-исследователь лаборатории микробиологии сибирской язвы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0003

Маринин Леонид Иванович, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0003

Мокриевич Александр Николаевич, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0117

#### Information about authors:

Valeria V. Kaptelova, Research Intern of the Laboratory of Anthrax Microbiology of the Department of Highly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003

Irina V. Bakhteeva, PhD (Med), Senior Researcher of the Laboratory of Anthrax Microbiology of the Department of Highly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003

Raisa I. Mironova, Researcher of the Laboratory of Anthrax Microbiology of the Department of Highly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003

Galina M. Titareva, PhD (Med), Senior Researcher of the Laboratory of Anthrax Microbiology of the Department of Highly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003

Yuliya O. Goncharova, Research Intern of the Laboratory of Anthrax Microbiology of the Department of Highly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003

Leonid I. Marinin, PhD (Med), Leading Researcher of the Laboratory of Anthrax Microbiology of the Department of Highly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003

Alexander N. Mokrievich, Dr. Sci. (Med), Chief Researcher of the Laboratory of Anthrax Microbiology of the Department of Highly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0117

## Бактерии, устойчивые к спиртосодержащим дезинфектантам, обладают повышенной антибиотикорезистентностью



Алкогольсодержащие дезинфектанты предотвратили тысячи смертей от метициллинрезистентного золотистого стафилококка, но оказались неэффективными против некоторых супербактерий. Исследователи во всем мире отмечают, что бактерии теперь намного лучше выживают в стерилизованных средах и продолжают вызывать инфекции. Если эта тенденция сохранится, больницы больше не смогут использовать эти дезинфектанты для предотвращения заражения пожилых людей и тех, кто слишком болен, чтобы бороться с инфекцией. С середины 2000-х гг. в больницах для стерилизации рук использовали спиртосодержащий гель, и риск серьезных инфекций постоянно снижался. Однако обнаружилось постепенное увеличение случаев ванкомицин-резистентных энтерококков. Энтеро-

кокки являются пятой по значению причиной сепсиса в Европе и составляют 10% случаев госпитальной инфекции (бактериемии) во всем мире. Кроме того, устойчивость к ванкомицину является серьезной проблемой, так как это один из немногих антибиотиков, который можно использовать для лечения бактерий с более сложными клеточными стенками, которые известны как грамположительные, такие как *E. coli* и энтерококки. Бактерии могут также распространять резистентные гены между видами, и распространение одного устойчивого вида может способствовать осложнению лечения других инфекций.

*Superbug warning as bacteria resist strong alcohol hand sanitisers, study finds*  
The Independent [WWW Document], n.d. URL <https://www.independent.co.uk/news/health/hand-sanitiser-bacteria-superbug-infection-alcohol-disinfectant-antibiotic-resistance-a8473101.html> (accessed 10.3.18).