

Характеристика культур, выделенных из почвы старого сибиреязвенного скотомогильника

Л.И.Маринин, Н.А.Шишкова, А.Н.Мокриевич, И.А.Дятлов

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

В современных условиях сохраняется риск заражения людей спорами *Bacillus anthracis* (возбудитель сибирской язвы), находящимися в почве, в результате хозяйственной профессиональной деятельности. В России зарегистрировано значительное количество почвенных очагов, которые проявляют себя в течение многих лет периодическими вспышками сибирской язвы среди сельскохозяйственных животных и людей. Наибольшую угрозу представляют сибиреязвенные скотомогильники (сибиреязвенные захоронения). Скотомогильником считается место для долговременного захоронения трупов сельскохозяйственных и домашних животных, погибших или забитых вследствие заболевания сибирской язвой. Попавший в почву возбудитель длительно сохраняет не только жизнеспособность, но и вирулентность.

Нами были исследованы пробы почвы, взятые на месте старого скотомогильника, существующего более 75 лет на берегу Иваньковского водохранилища в Конаковском районе Тверской области. Из этих проб были выделены три типа сибиреязвенных культур. Некоторые из них имели свойства, типичные для *B. anthracis*, другие отличались по ряду признаков. Была показана принципиальная возможность использования комплексной методики для типизации сибиреязвенных штаммов и их дифференциации от близкородственных микроорганизмов.

Ключевые слова: сибирская язва, спора *Bacillus anthracis*, почва, скотомогильники

Для цитирования: Маринин Л.И., Шишкова Н.А., Мокриевич А.Н., Дятлов И.А. Характеристика культур, выделенных из почвы старого сибиреязвенного скотомогильника. Бактериология. 2022; 7(1): 40–46. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-1-40-46

Characteristics of bacterial cultures isolated from the soil of an old anthrax cattle burial ground

L.I.Marinin, N.A.Shishkova, A.N.Mokrievich, I.A.Dyatlov

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Russian Federation

Today, as a result of economic activity, there is a risk of infection of people by the spores of *Bacillus anthracis* (the causative agent of anthrax), located in the soil. A lot of soil foci have been registered in Russia, which manifest themselves for many years as periodic outbreaks of anthrax among farm animals and people. Anthrax cattle burial grounds (anthrax burials) pose the greatest threat. Animal burial ground is a place for long-term burial of the corpses of agricultural and domestic animals which have been died or were slaughtered due to anthrax. The pathogen that has entered the soil during its stay in the soil for a long time retains not only viability, but also virulence.

We studied soil samples taken at the site of an old cattle burial site that has existed for more than 75 years on the banks of the Ivankovskoye reservoir in the Konakovo district of the Tver region. Three types of anthrax cultures were isolated from these samples. Some of them had properties typical of *B. anthracis*, while others differed in a number of characteristics. The fundamental possibility of using a complex technique for typing anthrax strains and their differentiation from closely related microorganisms was shown.

Key words: anthrax, *Bacillus anthracis* spores, soil, cattle burial grounds

For citation: Marinin L.I., Shishkova N.A., Mokrievich A.N., Dyatlov I.A. Characteristics of bacterial cultures isolated from the soil of an old anthrax cattle burial ground. Bacteriology. 2022; 7(1): 40–46. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-1-40-46

Для корреспонденции:

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 обл., г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24, ФБУН ГНЦ ПИМБ
Телефон: (4967) 36-0003
E-mail: mokrievich@obolensk.org

Статья поступила 21.02.2022 г., принята к печати 30.03.2022 г.

For correspondence:

Leonid I. Marinin, MD, PhD, Leading Researcher Laboratory of Anthrax Microbiology Department of Particularly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 "Quarter A" territory, Obolensk, Moscow region, 142279 Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003
E-mail: mokrievich@obolensk.org

The article was received 21.02.2022, accepted for publication 30.03.2022

Сибирская язва, о которой наслышаны многие, является особо опасным инфекционным заболеванием и относится к зооантропонозам – инфекционным заболеваниям, общим для животных и человека. Ее эпидемические проявления имеют большую социальную и экономическую значимость.

Несмотря на длительное существование инфекции, многочисленные исследования, связанные с разработкой методов диагностики и созданием средств специфической профилактики, проблема борьбы с сибирской язвой до настоящего времени актуальна для медицины и ветеринарии. Сибирская язва у людей постоянно регистрируется на территории России в виде единичных (спорадических) и, реже, групповых случаев. По классификации Всемирной организации здравоохранения, территория России относится к зоне спорадического проявления сибирской язвы [1]. При своевременном начале лечения летальных исходов не должно быть. Однако регистрируемые смертельные случаи (до 5–8% при кожной форме и 85–100% при висцеральных формах) дают основание считать сибирскую язву опасной инфекцией и оценивать современную эпидемическую обстановку по сибирской язве как довольно сложную, напряженную и не имеющую тенденции к стабилизации [2].

Сибирская язва опасна по ряду причин. Одной из них является длительная сохраняемость споровой формы возбудителя в окружающей среде. Высокая устойчивость спор возбудителя сибирской язвы к факторам внешней среды обуславливает формирование стойких очагов, в которых длительное время сохраняется опасность заражения человека и сельскохозяйственных животных [3].

Контаминированная почва может оставаться инфекционной многие годы, даже десятилетия. Одним из примеров служит вспышка, произошедшая в Савоие (Франция). Во время строительства автомагистрали в ходе работ было затронуто место захоронения животных, просуществовавшее 44 года после закрытия скотомогильника. Вследствие этого произошла контаминация пастбищ, что привело к возникновению заболеваний у животных, которые, в свою очередь, стали причиной заболеваний людей [4].

В Ямало-Ненецком автономном округе в 2016 г. произошла вспышка сибирской язвы, которая не регистрировалась на Ямале 75 лет [5].

Наблюдался случай сибирской язвы у человека, заразившегося на месте захоронения трупов сельскохозяйственных животных, проведенного более 80 лет тому назад [6].

Показательна вспышка сибирской язвы в Австралии, возникшая в местности, где заболевания не регистрировались 83 года [7].

Заслуживает внимания сообщение о выделении двух жизнеспособных штаммов возбудителя сибирской язвы из костей животных, найденных при археологических раскопках в Национальном Крюгер-парке (Южная Африка). Радиоуглеродный анализ этих костей показал, что они принадлежат животным, погибшим от сибирской язвы более 200 лет назад [8]. Имеется предположение, что возбудитель сибирской язвы может быть активным через 1300 лет [9]. Так, в 1982 г. в одном из колхозов Пермской области внезапно заболела сибирской язвой корова. В процессе расследования выяснилось, что летом на берегу реки Шаква

археологи обнаружили древнее поселение. В ходе раскопок появилось предположение, что примерно в VII веке здесь свирепствовала какая-то болезнь, от которой погибло немало людей и животных. Оставшиеся в живых жители поселения сожгли свои дома и покинули эти места. Около раскопов постоянно паслось колхозное стадо. В пробах грунта оказались споры возбудителя сибирской язвы, которые почти тринадцать столетий спокойно дремали в глубинах земли [10].

Все сказанное свидетельствует о том, что за время нахождения в почве возбудитель длительно сохраняет не только жизнеспособность, но и вирулентность.

Считается доказанной возможность непосредственного заражения животных и людей от почвы. Инфицирование споровой формой *Bacillus anthracis* отмечалось при заражении от контаминированной почвы в 3–14% от общего числа заболеваний [11–13]. Риск заражения людей спорами *B. anthracis*, находящимися в почве, сохраняется и в современных условиях в результате хозяйственной профессиональной деятельности [3].

Почвенные очаги сибирской язвы имеют важное значение в эпидемиологии этой инфекции. В Чувашской Автономной Республике с 1955 по 1961 г. из числа людей, заболевших сибирской язвой, инфицирован через почву был каждый четвертый, а после 1961 г. заражения людей произошли через почву в половине случаев [6].

Потенциал инфекции поддерживается существованием множества почвенных очагов, которые проявляют себя в течение многих лет периодическими вспышками сибирской язвы среди сельскохозяйственных животных и людей.

На основании информации о всех известных за последние более чем 100 лет стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктах в России создан «Кадастр стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов Российской Федерации» [13].

Всего в Российской Федерации за период 1900–2003 гг. зарегистрирована 36 091 локация стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов с почвенными очагами, в которых учтено 7940 сибирезавенных скотомогильников, представляющих наибольшую угрозу биобезопасности. Скотомогильником (сибирезавенным захоронением) считается место для долговременного захоронения трупов сельскохозяйственных и домашних животных, погибших или забитых вследствие заболевания сибирской язвой. Это территория, которая может быть причиной возникновения вспышки заболевания сибирской язвой. Причины такой вспышки могут быть самые различные – от прямого вмешательства человека до геоморфологических процессов [14]. Исходя из этого производится оценка потенциальной опасности скотомогильника, которая зависит от того, где именно и как был создан скотомогильник. Наименее опасны оформленные и зарегистрированные скотомогильники. Иначе обстоит дело со старыми или забытыми скотомогильниками, которые попадают в сферу хозяйственной деятельности человека или подвергаются природным ландшафтными изменениям (например, осыпание склонов, подмывание берегов рек, формирование оврагов и впадин).

К сожалению, на многих территориях до настоящего времени точно не известны все места гибели и захоронения

животных, погибших от сибирской язвы. Поэтому встречаются и неучтенные скотомогильники. Так, на основании паспортизации скотомогильников в Республике Бурятия выявлено 231 сибиреязвенное захоронение, из них всего лишь для 9 установлено точное местонахождение [15].

В 2000 г. в Тамбовской области источником заражения животных послужил разрытый при проведении земляных работ неучтенный скотомогильник, хотя ранее местность считалась благополучной по сибирской язве.

Таким образом, можно констатировать, что сибирская язва опасна по-прежнему, основными источниками заражения людей сибирской язвой являются больные животные или их трупы, а также инфицированная почва, которая служит естественной средой обитания и фактором самоподдержания популяции возбудителя во внешней среде.

Характерной особенностью сибирской язвы является возможность внезапной активизации инфекции. Примером может служить эпизоотия этой инфекции в Ямало-Ненецком автономном округе в 2016 г., неожиданно возникшая на фоне многих десятилетий полного благополучия [5].

Значительные трудности представляет обнаружение возбудителя сибирской язвы в почве, которая является одним из источников заражения. Так, Коронный А.В. [16] из 1000 образцов исследуемой почвы и воды, взятых из очагов сибирской язвы, выделил лишь 18 культур *B. anthracis*. С трудностью обнаружения сибиреязвенного микроба в почве мы столкнулись при исследовании проб почвы, взятых на месте старого скотомогильника, существующего более 75 лет на берегу Ивановского водохранилища в Конаковском районе Тверской области. Исторически известно, что в 1936 г. на указанной территории наблюдалась крупная вспышка сибирской язвы [17]. Плотность захоронений животных, павших от сибирской язвы в Конаковском районе, – 5–6 скотомогильников на каждые 3 км берега Ивановского водохранилища. Самыми опасными считаются скотомогильники около деревень Свердловлово и Дунина Гора.

В связи с вышесказанным **целью настоящей работы** было оценить опасность сибиреязвенных захоронений путем выделения из почвы и изучения свойств культур сибиреязвенного микроба.

Для генотипирования выделенных почвенных штаммов нами был использован метод многолокусного VNTR-типирования с использованием шести хромосомных (VrrA, VrrB1, VrrB2, VrrC1, VrrC2, Cg3) и двух плазмидных (PXO1(aat) и PXO2(at)) маркеров [18, 19]. В качестве контролей использовали сибиреязвенные штаммы и *Bacillus cereus* 504 из коллекции ГНЦ ПМБ.

Материалы и методы

Обследуемый участок был разделен на квадраты, и было отобрано 80 проб земли с различной глубины (1,5–2,0 м), так как именно на этом уровне в прошлом осуществлялось захоронение трупов животных. Для обнаружения и выделения возбудителя сибирской язвы использовали микробиологические (высев на LB-агар с полимиксином), биологические (заражение лабораторных животных) и генетические (полимеразная цепная реакция (ПЦР)) методы исследований [20].

Для исключения роста неспорных культур проводили термообработку почвенных взвесей при 83°C в течение 13 мин и затем высевали на агаровую среду по Луриа–Бертани (LB-агар) с полимиксином, а также на дифференциально-диагностические среды с фенолфталеинфосфатом натрия или с бромтимоловым синим. Это позволило нам сузить круг поиска возбудителя сибирской язвы.

В результате первичного анализа морфологии роста на агаровых средах было отобрано 90 подозрительных колоний. Культуры из всех колоний засеивали в бульонную питательную среду по Хоттингеру. После оценки характера их роста в жидкой среде осталось 20 подозрительных культур. В результате дополнительных исследований на основании комплекса признаков было отобрано 6 штаммов. На LB-агаре вырастали типичные по морфологии шероховатые колонии. По характеру роста в LB-бульоне выделенные штаммы можно разделить на три типа культур. Оценили способность штаммов продуцировать капсулу (на бикарбонатно-сывороточной среде по Green), лизабельность специфическими сибиреязвенными бактериофагами Гамма А-26 и Оболенск R1, чувствительность к ампициллину, гемолитическую активность и реакцию преципитации с сибиреязвенным γ -глобулином [21].

Спектры секретируемых почвенными штаммами белков изучали с помощью иммуноблоттинга с кроличьими моноспецифическими сыворотками, полученными нами ранее к отдельным компонентам сибиреязвенного токсина.

Молекулярно-генетическое типирование выделенных штаммов проводили с помощью ПЦР. В качестве контрольных использовали штаммы *B. anthracis* и близкородственного микроорганизма *B. cereus*. Из исследуемых и контрольных штаммов выделили ДНК и проверили в ПЦР с праймерами, разработанными Ramiisse et al. [19] для генома сибиреязвенного микроба – протективного антигена (pag), летального фактора (lef), отечного фактора (суа) генов плазмиды рХО1, капсульной субстанции (cap) генов плазмиды рХО2 и хромосомного маркера (Ba813). Для сравнения исследовали ДНК штаммов *B. anthracis* с различным гено- и фенотипами (81/1; 71/12; СТИ-1; СТИ-Rif4; 1; 10; 32; 193; Daccar) и 8 штаммов близкородственных бацилл.

Результаты и обсуждение

Полученные характеристики выделенных штаммов представлены в табл. 1.

Два штамма (П-1М и П-4о) обладали всеми типичными для возбудителя сибирской язвы характеристиками – типичный рост на агаровой питательной среде и в бульоне, лизабельность фагами Гамма и КВИЭВ, чувствительность к пенициллину (по тесту «жемчужного ожерелья»), образование зоны преципитации на агаре с сибиреязвенным γ -глобулином. Отсутствие капсулообразования на среде Green, вероятно, связано с их частичной аттенуацией в процессе длительного нахождения в почве. Три штамма, несмотря на типичный рост на агаровой среде, не лизировались фагами и были устойчивы к пенициллину.

Результаты молекулярно-генетического типирования выделенных штаммов представлены в табл. 2.

Как следует из приведенных результатов, только два из шести выделенных штаммов являются «полноценными»

Таблица 1. Биологические свойства штаммов, выделенных из почвы

Шифр штамма	Свойства штаммов					
	Проба с фагами	Зона ингибирования на среде с ампициллином, мм	Гемолиз на кровяном агаре	Проба с сибирезявленным глобулином	Морфология колоний на агаровой среде Green	Рост в LB-бульоне
П-1М	+	22	-	+	Шероховатые	Типичный
П-4о	+	10	-	+	Шероховатые	Типичный
П-4	+	3	+	±	Шероховатые	Осадок, бульон мутный
П-4ш	-	0	+	-	Шероховатые	Осадок, бульон мутный
П-4с	-	0	+	-	Шероховатые	Осадок, бульон мутный
П-14	-	0	+	-	Шероховатые	Осадок, бульон прозрачный

Таблица 2. Результаты постановки ПЦР с ДНК некоторых штаммов бацилл

Штамм	Результаты с праймерами				
	Ва813 152 п.н.	Саp264 п.н.	Lef385 п.н.	Суa546 п.н.	Раg747 п.н.
П-1М	+	+	+	+	+
П-4о	+	+	+	+	+
П-4	+	-	+	-	+
П-4ш	+	-	-	-	-
П-4с	+	-	-	-	-
П-14	+	-	-	-	-
<i>B. anthracis</i> 81/1	+	+	+	+	+
<i>B. anthracis</i> 71/12	+	+	+	+	+
<i>B. anthracis</i> СТИ-1	+	-	+	+	+
<i>B. anthracis</i> СТИ-Rif4	+	-	-	-	-
<i>B. anthracis</i> 10-атипичный	+	-	+	-	+
<i>B. anthracis</i> 32-атипичный	+	-	+	-	+
<i>B. anthracis</i> 193-атипичный	+	-	+	-	+
<i>B. anthracis</i> Daccar	+	-	+	-	+
<i>B. cereus</i> 504	+	-	-	-	-
<i>B. cereus</i> 217	+	-	-	-	-
<i>B. cereus</i> 164	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i> 168	-	-	-	-	-
<i>B. thuringiensis</i>	-	-	-	-	-
<i>B. polymixa</i>	-	-	-	-	-
<i>B. megaterium</i>	-	-	-	-	-

B. anthracis в генетическом отношении – это штаммы П-1 и П-4о (в ПЦР выявлены все пять видоспецифических ПЦР-фрагментов раg, lef, суa, саp, Ва813), что согласуется с характеристиками выделенных штаммов, приведенными выше.

Штамм П-4 можно отнести к атипичному бескапсульному варианту *B. anthracis*, сходному с атипичными штаммами *B. anthracis* 10, 32, 193 и Daccar, также лишенными гена отечного фактора. Штаммы П-4с, П-4ш и П-14 несли только один хромосомный маркер Ва813, который обнаруживается и у *B. cereus*, следовательно, их можно с уверенностью отнести к близкородственным штаммам.

По результатам изучения спектров секретируемых почвенными штаммами белков (данные не приведены) показано, что все три компонента токсина синтезируются только штаммами П-1М и П-4о, что подтверждает данные ПЦР.

Результаты определения величин переменных фрагментов по этим локусам приведены в табл. 3.

Из представленных данных видно, что выделенные из почвы штаммы П-1М и П-4о с типичными культурально-морфологическими признаками, чувствительные к пенициллину и сибирезявленному бактериофагу, являющиеся типичными штаммами *B. anthracis* по результатам ПЦР с видоспецифическими праймерами, укладываются также в схему VNTR-типирования, разработанную для *B. anthracis*. Полученные значения величин фрагментов по 8 локусам позволяют отнести штаммы П-1М и П-4о к подгруппе *B. anthracis* А3. Следовательно, из почвы старого скотомогильника нами выделены два типичных эпидемически значимых штамма *B. anthracis*, несущих генетические элементы, кодирующие синтез компонентов токсина и капсулы.

Штамм П-4, отличающийся по ряду признаков от типового, а именно: по характеру роста в жидкой питательной среде, по гемолизу эритроцитов и по слабой чувствительности к пенициллину, имеет шесть из восьми совпадающих

Таблица 3. Величины фрагментов vrr-областей штаммов, выделенных из сибирезявленного скотомогильника

Штамм	Величины фрагментов, п.о.							
	VrrA	VrrB1	VrrB2	VrrC1	VrrC2	Cg3	PXO1	PXO2
П-1М	313	228	164	613	532	153	133	135
П-4о	315	228	161	611	533	153	130	136
П-4	313	229	161	-	533	154	133	-
П-4ш	278	264	-	-	336	-	-	-
П-4с	285	264	163	-	312	-	-	-
П-14	294	265	164	-	324	-	-	-
81/1	313	230	161	609	600	152	135	136
1	324	230	162	617	601	153	136	137
71/12	315	230	161	611	527	153	135	136
СТИ-1	316	229	162	613	602	153	133	136
Daccar	298	229	161	496	472	156	134	144
10	315	230	160	613	599	156	136	136
32	312	230	161	-	528	155	133	136
193	310	229	163	673	585	-	-	136
<i>B. cereus</i> 504	282	266	164	-	308	-	130	-

с известными величинами VNTR-локусов, в частности, VrrA, VrrB1, VrrB2, VrrC2, Cg3, PХО1. Поскольку не амплифицировались фрагменты, соответствующие локусу VrrC1 и капсуле, то отнести штамм П-4 к какой-либо VNTR-подгруппе оказалось невозможным. Следовательно, нами выделен ранее не охарактеризованный атипичный штамм *B. anthracis*, не представляющий эпидемической опасности, но требующий дальнейшего детального изучения.

Для остальных штаммов – П-4ш, П-4с и П-14 – по величинам vrr-локусов получена картина, сходная с таковой для штамма *B. cereus* 504. Для уточнения полученных данных нами специально был отсекален фрагмент рХО1-фрагмент штамма *B. cereus* 504.

Результаты секвенса фрагмента ДНК *B. cereus* полностью укладываются в классификацию, предложенную Р.Keim для *B. anthracis* [18]. Это может быть связано с очень высокой степенью гомологии генома, что отражает недавнюю эволюцию *B. anthracis* от родительской субгруппы *B. cereus*. Показано, что некоторые изоляты *B. cereus* содержат последовательности, сходные более чем с половиной последовательностей открытых рамок считывания плазмиды рХО1 *B. anthracis*, причем основная часть ДНК-фрагментов *B. cereus* имела сходство от 80 до 98%.

Совпадение данных по локусам VrrB2 и рХО1 *B. anthracis* и *B. cereus* значительно затруднило однозначную дифференциацию этих видов, тем не менее, поскольку по всем остальным локусам имелись значительные отличия от *B. anthracis*, штаммы П-4ш, П-4с и П-14 с большой степенью вероятности можно отнести к *B. cereus*.

Это еще одно свидетельство сложности процесса дифференциации бациллярных штаммов. С целью повышения эффективности типирования бацилл в настоящее время предлагаются различные комбинации методов в зависимости от поставленных задач, но, вследствие высокой генетической мономорфности сибиреязвенного микроба, мультилокусный VNTR-анализ может оказаться наиболее приемлемым для типирования *B. anthracis*.

Оценивая полученные данные по идентификации выделенных из старого скотомогильника бацилл, можно сделать вывод о том, что для точного подтверждения выделения возбудителя сибирской язвы по-прежнему необходимо проведение комплексных исследований – микробиологических, иммунобиологических и молекулярно-генетических. Микробиологический анализ показал присутствие в почве скотомогильника трех культур *B. anthracis* (П-1М, П-4, П-4с), обладающих всеми типичными для возбудителя сибирской язвы характеристиками – лизабельность фагами Гамма и К-ВИЭВ, чувствительность к пенициллину, типичный рост в бульоне. Эти данные были подтверждены результатами ПЦР с пятью праймерами к *rag*, *lef*, *суа*, *сар*, *Ва 813*, разработанными для генома сибиреязвенного микроба. Штамм П-4 лишен капсульной субстанции и имеет дефект токсина, поскольку лишен отечного фактора. Отсутствие капсулы при культивировании этих штаммов на среде Green, вероятно, связано с частичной аттенуацией за время нахождения в почве. Три другие штамма (П-4ш, П-4с и П-14) не лизировались фагами и были устойчивы к пенициллину. Они первично были отобраны по морфологии колоний и характеру роста в бульоне. Постановка ПЦР с ДНК этих штаммов по-

казала, что у них отсутствуют все ПЦР-фрагменты, кроме хромосомного маркера *Ва813*.

Дополнительные исследования выделенных штаммов с использованием мультилокусного VNTR-анализа позволили отнести выделенные штаммы П-1М и П-4с к подгруппе *B. anthracis* А3, выявить ранее не охарактеризованный атипичный штамм *B. anthracis* П-4 и отнести выделенные штаммы П-4ш, П-4с и П-14с с нетипичными для сибиреязвенного микроба свойствами к *B. cereus*.

Таким образом, из почвы скотомогильника были выделены три типа сибиреязвенных культур. Некоторые из них имели свойства, типичные для *B. anthracis*, другие отличались по ряду признаков. Это согласуется с имеющимися сведениями о выделении из объектов внешней среды, наряду с типичными штаммами, атипичных мутантов, значение которых в эпидемиологии и патогенезе сибирской язвы остается не ясным и требует изучения. Была показана принципиальная возможность использования комплексной методики для типизации сибиреязвенных штаммов и их дифференциации от близкородственных микроорганизмов.

Почва скотомогильника была обработана 4%-м раствором формальдегида. Через 2 мес. отобрали пробы почвы и провели их микробиологический анализ. Несмотря на проведенную обработку, вновь были выделены два типичных сибиреязвенных штамма. Лишь после повторной обработки нам не удалось обнаружить возбудителя сибирской язвы.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was carried out within the framework of the sectorial program of Rosпотребнадзор.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература

- Hugh-Jones ME. Quality of reports – OIE World Animal Health in 1993 and the 1993 FAO-OIE-WHO Animal Health Yearbook. Proc. Intern. Workshop on Anthrax. Winchester, England, Sept.19-21, 1995. Salisbury Med. Bull. Special Supplement. 1996;87:3-4.
- Об усилении мероприятий, направленных на профилактику сибирской язвы в Российской Федерации. Постановление Главного Государственного санитарного врача Российской Федерации №81 от 10.12.2014.
- Симонова ЕГ, Картавая СА, Локтионова МН, Ладный ВИ. Эпидемиологическая опасность сибиреязвенных захоронений: теоретико-методологические аспекты. Медицина в Кузбассе. 2013;12(2):26-31.
- Descotes IP, Joubert L. Reconversions epidemiologiques actuelles de la fièvre charbonneuse et opportunité de la reactualisation de la réglementation spéciale. Rev Med Vet. 1978;129(8-9):1209-21.
- Попова АЮ, Демина ЮВ, Ежлова ЕБ, и др. Опыт ликвидации вспышки сибирской язвы на Ямале в 2016 году. Под ред. Поповой АЮ, Куличенко АН. Ижевск: ООО «Принт-2»; 2017, 313 с.

6. Андронников ВА. Опыт организации мероприятий по профилактике сибирской язвы в Чувашии. В сб.: Вопросы эффективности противосибирезавенных мероприятий. Матер. Всесоюз. науч. симпозиума IX Пленарного заседания междуведомств. научно-методич. комиссии по борьбе с сибирской язвой. М., 1974, с. 18-20.
7. 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. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1992.tb04876.x
8. Van de Vos. The ecology of antrax in the Kruger National Park, South Africa. Proc. Intern. Workshop on Anthrax. Winchester, England, Apr. 11-13, 1989. Salisbury Med. Bull. Special Supplement. 1990;68:19-23.
9. Anon. Milzbrandvirus nach 1300 Jahren noch aktiv? Gesundheitspolitische Umschau. 1982;33:60.
10. Тамиранов А. Сибирская язва – истоки названия. LiveJournal [Электронный ресурс]. URL: <https://tamiranov.livejournal.com/352611.html> (дата обращения: 21.02.2022).
11. Артеменков МП. Эпизоотологическая и эпидемиологическая обстановка по сибирской язве и меры борьбы с ней в Семипалатинской области Казахстана. В сб.: Достижения и перспективы борьбы с сибирской язвой в СССР. Сб. тез. докл. X Пленарного засед. Межведомств. комиссии по борьбе с сибирской язвой. М., 1978, с. 31-32.
12. Дранкин ДИ. Зоонозы (Болезни, передающиеся людям от животных). М.: Знание; 1983, 96 с.
13. Стройновский ФС. Случай сибирской язвы (*Pustula maligna*). Вестник общественной гигиены, судебной и практической медицины. 1906;4:504-508.
14. Николаенко ДВ. Скотомогильник как объект и предмет естественнонаучного исследования. Случай Украины. Энвайронментальная эпидемиология. 2011;2:211-329.
15. Симонова ЕГ, Галкин ВВ, Локтионова МН, Ладный ВИ. Сибирезавенные скотомогильники на территории РФ и их биологическая безопасность. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2010;4:23-6.
16. Коронный АВ. Развитие бацилл антракса в почве и процессы изменчивости их. Сб. науч. трудов Эстонской сельскохозяйственной академии. Т. 4. Тарту, 1958, с. 99-105.
17. Кноп АГ. Влияние антропогенного преобразования природы на почвенные очаги сибирской язвы. В сб.: Современные проблемы зоонозных инфекций. Тез. докл. Всесоюзной межведомственной конфер. Симферополь, 1981. М., 1981, с. 25-27.
18. Keim P, Van Ert MN, Pearson T, Vogler AJ, Huynh LY, Wagner DM. Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales. Infect Genet Evol. 2004 Sep;4(3):205-13. DOI: 10.1016/j.meegid.2004.02.005
19. Ramiisse V, Patra G, Garrigue H, Guesdon JL, Mock M. Identification and characterization of *Bacillus anthracis* by multiplex PCR analysis of sequences on plasmids pXO1 and pXO2 and chromosomal DNA. FEMS Microbiol Lett. 1996 Nov 15;145(1):9-16. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1996.tb08548.x
20. Лабораторная диагностика сибирской язвы и идентификация *Bacillus anthracis*. Методические указания (Проект). Ставрополь, 2019, 70 с.
21. Маринин ЛИ, Дятлов ИА, Мокриевич АН, и др. Методы изучения биологических и молекулярно-генетических свойств возбудителя сибирской язвы. Учебно-методическое пособие. Под ред. Дятлова ИА. М.: «Династия»; 2021, 240 с.
2. On strengthening measures aimed at the prevention of anthrax in the Russian Federation. Resolution of the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation No 81 dated 10.12.2014. (In Russian).
3. Simonova EG, Kartavaya SA, Loktionova MN, Ladny VI. Epidemiological hazard of anthrax animal burials: theoretical and methodological aspects. Medicine in Kuzbass. 2013;12(2):26-31. (In Russian).
4. Descotes IP, Joubert L. Reversions epidemiologiques actuelles de la fièvre charbonneuse et opportunités de la réactualisation de la réglementation spéciale. Rev Med Vet. 1978;129(8-9):1209-21.
5. Popova AYU, Demina YuV, Ezhlova EB, et al. The experience of eliminating the outbreak of anthrax in Yamal in 2016. Edited by Popova AYU, Kulichenko AN. Izhevsk: «Print-2» Publ.; 2017, 313 p. (In Russian).
6. Андронников ВА. Опыт организации мероприятий по профилактике сибирской язвы в Чувашии. В сб.: Вопросы эффективности противосибирезавенных мероприятий. Матер. Всесоюз. науч. симпозиума IX Пленарного заседания междуведомств. научно-методич. комиссии по борьбе с сибирской язвой. М., 1974, с. 18-20.
7. 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. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1992.tb04876.x
8. Van de Vos. The ecology of antrax in the Kruger National Park, South Africa. Proc. Intern. Workshop on Anthrax. Winchester, England, Apr. 11-13, 1989. Salisbury Med. Bull. Special Supplement. 1990;68:19-23.
9. Anon. Milzbrandvirus nach 1300 Jahren noch aktiv? Gesundheitspolitische Umschau. 1982;33:60.
10. Тамиранов А. Anthrax – the origins of the name. LiveJournal [Электронный ресурс]. URL: <https://tamiranov.livejournal.com/352611.html> (accessed 21.02.2022). (In Russian).
11. Артеменков МП. Эпизоотологическая и эпидемиологическая обстановка по сибирской язве и меры борьбы с ней в Семипалатинской области Казахстана. В сб.: Достижения и перспективы борьбы с сибирской язвой в СССР. Сб. тез. докл. X Пленарного засед. Межведомств. комиссии по борьбе с сибирской язвой. М., 1978, с. 31-32.
12. Дранкин ДИ. Зоонозы (Болезни, передающиеся людям от животных). М.: Знание; 1983, 96 с.
13. Стройновский ФС. Случай сибирской язвы (*Pustula maligna*). Вестник общественной гигиены, судебной и практической медицины. 1906;4:504-508.
14. Николаенко ДВ. Скотомогильник как объект и предмет естественнонаучного исследования. Случай Украины. Энвайронментальная эпидемиология. 2011;2:211-329.
15. Симонова ЕГ, Галкин ВВ, Локтионова МН, Ладный ВИ. Сибирезавенные скотомогильники на территории РФ и их биологическая безопасность. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2010;4:23-6.
16. Коронный АВ. Развитие бацилл антракса в почве и процессы изменчивости их. Сб. науч. трудов Эстонской сельскохозяйственной академии. Т. 4. Тарту, 1958, с. 99-105.
17. Кноп АГ. Влияние антропогенного преобразования природы на почвенные очаги сибирской язвы. В сб.: Современные проблемы зоонозных инфекций. Тез. докл. Всесоюзной межведомственной конфер. Симферополь, 1981. М., 1981, с. 25-27.
18. Keim P, Van Ert MN, Pearson T, Vogler AJ, Huynh LY, Wagner DM. Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales. Infect Genet Evol. 2004 Sep;4(3):205-13. DOI: 10.1016/j.meegid.2004.02.005
19. Ramiisse V, Patra G, Garrigue H, Guesdon JL, Mock M. Identification and characterization of *Bacillus anthracis* by multiplex PCR analysis of sequences on plasmids pXO1 and pXO2 and chromosomal DNA. FEMS Microbiol Lett. 1996 Nov 15;145(1):9-16. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1996.tb08548.x
20. Лабораторная диагностика сибирской язвы и идентификация *Bacillus anthracis*. Методические указания (Проект). Ставрополь, 2019, 70 с.
21. Маринин ЛИ, Дятлов ИА, Мокриевич АН, и др. Методы изучения биологических и молекулярно-генетических свойств возбудителя сибирской язвы. Учебно-методическое пособие. Под ред. Дятлова ИА. М.: «Династия»; 2021, 240 с.
10. Tamiranov A. Anthrax – the origins of the name. LiveJournal [Электронный ресурс]. URL: <https://tamiranov.livejournal.com/352611.html> (accessed 21.02.2022). (In Russian).
11. Artemenkov MP. Epizootological and epidemiological situation of anthrax and measures to combat it in the Semipalatinsk region of Kazakhstan. In: Achievements and prospects of the fight against anthrax in the USSR. Proceedings of X Plenary meeting of the Interdepartmental Commission on Anthrax Control. Moscow, 1978, pp. 31-32. (In Russian).
12. Drankin DI. Zoonoses (Diseases transmitted to humans from animals). Moscow: "Znanie" Publ.; 1983, 96 p. (In Russian).
13. Stroinovskii FS. Sluchai sibirskoi yazvy (*Pustula maligna*). Vestnik obshchestvennoi gigieny, sudebnoi i prakticheskoi meditsiny. 1906;4:504-508. (In Russian).
14. Nikolaenko DV. Skotomogil'nik kak ob'ekt i predmet estestvennonauchnogo issledovaniya. Sluchai Ukrainy. Envaironmental'naya epidemiologiya. 2011;2:211-329. (In Russian).
15. Simonova EG, Galkin VV, Loktionova MN, Ladnyi VI. Anthrax cattle burial grounds in Russia and their biosafety. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2010;4:23-6. (In Russian).
16. Koronnyi AV. The development of anthrax bacilli in the soil and the processes of their variability. Proceedings of the Estonian Agricultural Academy. Vol. 4. Tartu, 1958, pp. 99-105. (In Russian).
17. Knop AG. The influence of anthropogenic transformation of nature on soil foci of anthrax. In: Modern problems of zoonotic infections. Proceedings All-Union Interdepartmental Conference. Simferopol, 1981. Moscow, 1981, pp. 25-27. (In Russian).
18. Keim P, Van Ert MN, Pearson T, Vogler AJ, Huynh LY, Wagner DM. Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales. Infect Genet Evol. 2004 Sep;4(3):205-13. DOI: 10.1016/j.meegid.2004.02.005

References

19. Ramiise V, Patra G, Garrigue H, Guesdon JL, Mock M. Identification and characterization of *Bacillus anthracis* by multiplex PCR analysis of sequences on plasmids pX01 and pX02 and chromosomal DNA. FEMS Microbiol Lett. 1996 Nov 15;145(1):9-16. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1996.tb08548.x
20. Laboratory diagnosis of anthrax and identification of *Bacillus anthracis*. Methodological guidelines (Project). Stavropol, 2019, 70 p. (In Russian).
21. Marinin LI, Dyatlov IA, Mokrievich AN, et al. Methods of studying the biological and molecular genetic properties of the causative agent of anthrax. Edited by Dyatlov IA. Moscow: "Dynasty" Publ.; 2021, 240 p. (In Russian).

Информация об авторах:

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

Мокриевич Александр Николаевич, доктор медицинских наук, заведующий отделом особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Дятлов Иван Алексеевич, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about authors:

Nina A. Shishkova, PhD (Biological Sciences), Leading Researcher Laboratory of Anthrax Microbiology Department of Particularly dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

Alexander N. Mokrievich, MD, PhD, DSc, Head of the Department of Highly Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

Ivan A. Dyatlov, Academician of RAS, MD, PhD, DSc, Professor, Director of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

НОВОСТИ НАУКИ

Новый метод может устранить устойчивость к антибиотикам у смертельных бактерий

Группа исследователей из Техасского университета в Остине нашла новый способ ослабить устойчивость к антибиотикам бактерий, вызывающих болезни человека, в том числе кишечной палочки, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa*. Команда сделала бактерии снова уязвимыми для антибиотиков, ингибируя определенный белок, который управляет формированием устойчивости у бактерий.

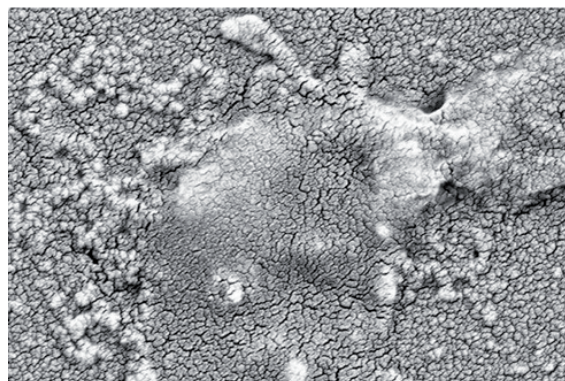
Январское исследование, проведенное другой командой в The Lancet, показало, что устойчивость к противомикробным препаратам является непосредственной причиной по меньшей мере 1,27 миллиона смертей во всем мире в 2019 году, что делает устойчивость к антибиотикам одной из основных причин смерти в мире.

Устойчивые к антибиотикам бактерии имеют в своем арсенале множество различных белков, которые нейтрализуют антибиотики. Для правильного функционирования эти резистентные белки должны иметь правильную форму. Исследователи обнаружили, что еще один белок, называемый DsbA, помогает сворачивать белки резистентности в такие формы.

Для своего экспериментального исследования, которое недавно было опубликовано в журнале eLife, ученые ингибировали DsbA, используя химические вещества, которые нельзя использовать непосредственно у пациентов-людей. Теперь команда планирует работать над созданием ингибиторов, которые могут обеспечить тот же результат и безопасно использоваться на людях.

Их цель – объединить ингибитор DsbA с существующими антибиотиками, чтобы восстановить способность препаратов убивать бактерии. Поскольку он нацелен на механизм, который помогает собирать устойчивые к антибиотикам белки у опасных бактерий, этот подход сделает несколько типов белков, критически важных для устойчивости, неэффективными, лишив их способности сворачиваться или создавать дисульфидные связи.

Результаты показывают, что, воздействуя на образование дисульфидных связей и укладку белков, можно обратить вспять устойчивость к антибиотикам у нескольких основных патогенов и механизмов устойчивости. Это означает, что разработка клинически полезных ингибиторов DsbA в будущем может предложить новый способ лечения резистентности. инфекций с использованием доступных в настоящее время антибиотиков.



New method can disarm antibiotic resistance in deadly bacteria [Электронный ресурс].
URL: <https://phys.org/news/2022-02-method-antibiotic-resistance-deadly-bacteria.html> (дата обращения: 28.02.2022).