

Е.И.Еременко, А.Г.Рязанова, Е.А.Цыганкова, О.И.Цыганкова, А.Н.Куличенко

ГЕНОТИПИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ШТАММОВ *BACILLUS ANTHRACIS* С РАЗНЫМ ПРОЯВЛЕНИЕМ ПРИЗНАКОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ПАТОГЕННОСТЬЮ

ФГУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт»

Подобрана совокупность штаммов возбудителя сибирской язвы и их производных с отличающейся вирулентностью. Получена характеристика этих штаммов по фенотипическим свойствам, VNTR-, SNP- и SNR-локусам генома, плазмидному составу, генам капсуло- и токсинообразования, а также некоторым локусам, продукты которых связаны с патогенностью. Выявлена корреляция определенного MLVA-генотипа с комплексом фенотипических свойств, характерным для штаммов *Bacillus anthracis* с измененной вирулентностью.

Ключевые слова: *B. anthracis*, штаммы возбудителя сибирской язвы, фенотипические свойства, VNTR-, SNP-, SNR-локусы.

В последнее время появились новые возможности получать геномные характеристики сибиреязвенного микроба, основанные на многолокусном анализе областей генома с варибельным числом tandemных повторов (MLVA), единичных нуклеотидных полиморфизмов (SNP) и повторов (SNR). Хотя эти характеристики связывают главным образом с географическим происхождением штаммов, нами получены предварительные данные, позволяющие предполагать связь их варибельности с патогенными свойствами.

Нами ранее были выделены штаммы *B. anthracis* и их производные, отличающиеся по вирулентности.

Цель работы – получение характеристики фенотипических и генотипических свойств, предположительно или определенно ассоциирующихся с патогенностью, у штаммов с отличающейся вирулентностью и выделенных из разных экологических ниш, и получение новых данных о корреляции этих свойств с вирулентностью изолятов.

Материалы и методы

В работе использовали набор штаммов сибиреязвенного микроба, выделенных на протяжении длительного отрезка времени из разных источников, в различных географических регионах, и их производных с отличающейся вирулентностью, а также стандартный вирулентный штамм 81/1. В результате в модельной системе штаммов были представлены изоляты микроба, пребывавшего на разных стадиях жизненного цикла (табл. 1).

Определение фенотипа (ФТ) штаммов проводили согласно МУК 4.2.29.06-08 «Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы».

О наличии плазмид судили по результатам плазмидного скрининга, а о присутствии генов – по амплификации в полимеразной цепной реакции (ПЦР) их фрагментов. В ПЦР использовали олигонуклеотидные праймеры к генам протективного антигена (ПА) *pag*, отечного фактора *суа*, летального фактора *lef*, оперону прорастания спор *gerX* [2] (плазми-

да рХО1), капсулообразования *B. anthracis capC*, *capBCA* (плазмида рХО2) [13], к ряду генов хромосомной локализации, имеющих отношение как к проявлению патогенности, так и, вероятно, к альтернативным жизненно важным функциям: *plcR* (плейотропный транскрипционный регулятор факторов патогенности) [6], *sap* (белок S-слоя *B. anthracis*) [1], *pipIcba* (фосфатидил инозитол-специфическая фосфолипаза С *B. anthracis*), *plcA* (фосфатидил холин-специфическая фосфолипаза С *B. thurigiensis*), *inA* (иммунный ингибитор *B. anthracis*) [9], *E4* (бактериофагосвязывающий участок *B. anthracis*) [5], *rpoB* (β-субъединица РНК-полимеразы *B. anthracis*) [12], *alo* (антролизин) [14], *gerYA*, *gerYB*, *gerYC* (гены хромосомного оперона прорастания спор) [8].

Генотипирование штаммов проводили методом MLVA 16 хромосомных и 2 плазмидных областей генома *B. anthracis* с варибельным числом tandemных повторов (VNTR) [10,11]. Генетическую варибельность хромосомного локуса 16 Ch, содержащего SNR, и выявление SNP гена ПА методом анализа полиморфизма длины амплификационно-рестрикционных фрагментов (PCR-RFLP анализ) проводили в соответствии с описанием Е.А.Цыганковой [4]. Для филогенетического анализа штаммов использовали программы из пакета программного обеспечения Phylip 3.6.

Результаты и обсуждение

Из 10 фенотипических признаков варибельными оказались 5: капсуло- и токсинообразование *in vitro*, рост на минимальной синтетической среде без триптофана, лизис отмытых эритроцитов барана и гидролиз альбумина.

Дефектность фенотипических признаков не всегда могла объясняться отсутствием плазмид или отрицательными результатами ПЦР с праймерами к их генам (табл. 2).

Так, ряд штаммов не продуцировал токсин в тесте *in vitro* при наличии плазмиды токсинообразования рХО1 и определяемых в ПЦР фрагментов генов

Происхождение использованных в работе штаммов *B. anthracis*

Исходные штаммы или производные	Источник, место выделения штамма, метод отбора производного
81/1	Содержимое карбункула больного сибирской язвой (Ставропольский край)
137-1, 137-2, 137П, 140-1, 140-2, 140П	Почва старого скотомогильника (Калининская область)
140П Cap ⁻	Штамм 140 П, селекция по признаку капсулообразования
140П Cap ⁻ б/м	Штамм 140П Cap ⁻ , пассирование через организм белой мыши
12/16	Содержимое карбункула больного сибирской язвой (Республика Дагестан)
12/16-S, 12/16-1	Штамм 12/16, селекция по признаку капсулообразования
12/16-1 IV п.	Штамм 12/16-1, пассирование через организм белой мыши
228	Труп овцы (Урал)
228/2, 228/4, 228/8	Штамм 228, селекция по признаку капсулообразования
228 прот	Штамм 228, селекция по признаку независимости от триптофана
1(CO)	Труп крупного рогатого скота (Республика Северная Осетия-Алания)
1(CO)-S, (CO)-S Cap ⁻	Штамм 1(CO), селекция по признаку капсулообразования
1(CO) RBA9-1, 1(CO) RBA9-4	Штамм 1(CO), селекция по признаку устойчивости к сибиреязвенному бактериофагу ВА9
1(CO) RK-1	Штамм 1(CO), селекция по признаку устойчивости к сибиреязвенному бактериофагу К
14/41	Содержимое язвы больного сибирской язвой (Республика Дагестан)
14/41-1, 14/41-1aSM	Штамм 14/4, селекция по признаку капсулообразования
14/41 Trp ⁺	Штамм 14/4, селекция по признаку независимости от триптофана

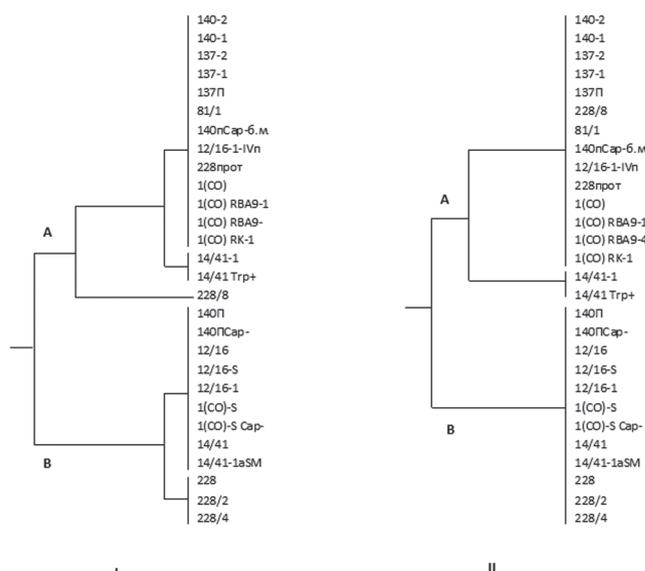
pag, *lef*, *суа*. Эти штаммы были вирулентными для белых мышей, но авирулентными или умеренно вирулентными для кроликов. Вариант 1(CO)RK-1 был неспособен к прорастанию спор в атмосфере с повышенным содержанием CO₂, что не позволяло оценить его капсуло- и токсинообразование *in vitro*, хотя он имел полный набор генов прорастания спор и других исследованных генов. Все остальные штаммы также имели хромосомные гены прорастания спор *ger* Y(A, B, C). Плазмидный ген *gerX* отсутствовал у рХО1-вариантов, однако это не сказывалось на способности их спор прорасти *in vitro*. Лишены этой плазмиды и соответствующих генов штаммы 1(CO) RBA9-1, 228/4 и 1(CO) RBA9-4, при этом последние два не имели также капсульной плазмиды рХО2 и ее генов (*cap* ВСА, *cap*С). Штаммы 137-1, 137-2, 137П, 140-1, 140-2, 140П Cap⁻, 12/16-1, 228/2, 228/8, 1(CO)-S Cap⁻, 14/41-1 и 14/41 Trp⁺ не имели плазмиды рХО2, генов *cap*С, *cap*ВСА, и не продуцировали капсулу *in vivo* и *in vitro*. Все моно- и бесплазмидные штаммы, а также вариант 1(CO) RK-1 были авирулентными для всех лабораторных животных.

У всех штаммов, кроме дефектного по генам *plcA* и *inA* варианта 1(CO) RBA9-1, амплифицировались фрагменты генов фосфолипаз, однако лецитиназную активность обнаруживал только 14/41 Trp⁺.

Отсутствие экспрессии некоторых признаков при наличии их генетических детерминант могло объясняться нарушением генетической регуляции, например, вследствие мутации в гене плейотропного транскрипционного регулятора факторов патогенности *plcR* [6].

MLVA-генотипирование штаммов по 6 хромосомным и 2 плазмидным локусам [10] позволило идентифицировать 7 отличающихся генотипов

(табл. 2). Примечательно, что штаммы с одинаковым ФТ и характером вирулентности относились к одним и тем же или близким генотипам. Дендрограммы UPGMA анализа восьми [11] и пяти хромосомных локусов [10] (рис. 1, I и II) четко отражают деление 5 или 3 генотипов штаммов на 2 основных кластера. В кластере А сосредоточены токсигенные вирулентные штаммы с ФТ (Cap⁺CO₂Tox⁺Trp⁺Hly⁺Prt⁺) или токсигенные авирулентные штаммы с ФТ (Cap⁻Tox⁺Trp⁺Hly⁻Prt⁻), соответствующим бескапсульным вакцинным штаммам типа вакцины СТИ. В кластере В были представлены атипичные атоксигенные штаммы с ФТ (Cap⁺CO₂Tox⁻Trp⁻Hly⁻Prt⁻), (Cap⁺O₂Tox⁻Trp⁻Hly⁻Prt⁻)



Кластеризация MLVA-генотипов штаммов *B. anthracis* на основе анализа 13 хромосомных локусов:

I – 8 из 10 локусов Seb-Bams (Le Fleche. *et al.*, 2000);
 II – 5 из 6 локусов (Keim P. *et al.*, 2000)

Фенотипическая и геномная характеристика штаммов сибирезвеного микроба

Исходные штаммы или производные	Фенотипические признаки										Геномная характеристика				MLVA генотип по 8 локусам [10]
	Cap ^{+CO₂}	Cap ^{+O₂}	Tox	Trp	Hly	Prt	Lec	Spo	Ger	Vir*	Плазмиды/гены		Хромосомные гены		
											pXO1/ <i>pagA, cya, lef, gerX</i>	pXO2/ <i>capBCA, capC, amiC</i>	<i>in A, plcA</i>	<i>sap, gerYA, gerYB, gerYC, rpoB, pipIcba, alo, E4, dlp-1, dlp-2, plcR, dhp73.009</i>	
81/1	+	-	+	+	+	+	-	+	+	++	+	+	+	+	1
137-1	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	1H2*
137-2	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	1H2
137П	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	1H2
140-1	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	1H2
140-2	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	1H2
140 П	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	2
140П Cap ⁻	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	2H2
140П Cap ⁻ б/м	+	-	+	+	+	+	-	+	+	++	+	+	+	+	1
12/16	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	2
12/16-S	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	2
12/16-1	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	2H2
12/16-1 IV п	+	-	+	+	+	+	-	+	+	++	+	+	+	+	1
228	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	2
228/2	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	2H2
228/4	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	2H12*
228/8	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	1H2
228 прот	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	1
1(CO)	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	1
1(CO)-S	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	2
1(CO)-S Cap ⁻	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	2H
1(CO) RBA9-1	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	1H1*
1(CO) RBA9-4	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	1H12
1 (CO) RK-1	**	-	**	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	1
14/41	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	2
14/41-1	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	3H
14/41-1aSM	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	2
14/41 Trp ⁺	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	3H

Примечания: Cap^{+CO₂} – капсулообразование *in vitro* в атмосфере с 5–25 % CO₂; Cap^{+O₂} – капсулообразование *in vitro* в воздушной атмосфере; Tox – токсинообразование *in vitro*; Trp – рост на минимальной питательной среде без триптофана; Hly – гемолиз отмытых эритроцитов барана; Prt – протеолиз альбумина и гемоглобина; Lec – лецитиназная активность; Spo – спорообразование; Ger – прорастание спор; Vir* – вирулентность для лабораторных животных: «++» – высокая для белых мышей и кроликов; «+» – высокая для белых мышей, умеренная для кроликов; «±» – высокая для белых мышей, отсутствие для кроликов; «-» – отсутствие для всех видов животных; «**» – признак невозможно определить; H – отсутствие амплификации локусов: ♣ – pXO1at; ♠ – pXO2at; ♠ – pXO1at и pXO2at.

и (Cap⁻Tox⁻Trp⁻Hly⁻Prt⁻), с избирательной вирулентностью и авирулентные.

Известно о географической приуроченности генотипов штаммов сибирезвеного микроба [3, 7, 10]. Весьма неожиданным оказалось полное совпадение по 7 из 8 локусов генотипа № 2 атипичных штаммов из нашей коллекции с генотипом № 89, который имел единственный штамм, выделенный в Северной Каролине (США), вирулентность которого не описана [10]. Ввиду явной территориальной разобщенности регионов, где были выделены штаммы, сходство их генотипов едва ли могло быть следствием общего географического происхождения или завоза материа-

ла, содержащего возбудитель сибирской язвы. Более вероятным представляется, что этот штамм так же, как и наши штаммы из кластера В, имеет ассоциированные с патогенностью атипичные свойства и соответствующий генотип.

Было также установлено, что у некоторых штаммов, в частности 12/16 и 14/41, имелось по два аллеля ряда локусов, что могло подтверждать значительную гетерогенность их клеточной популяции на уровне генома.

Анализ SNP гена ПА и полиморфизма SNR в хромосомном локусе 16 Ch не выявил какой-либо общей закономерности в вариабельности.

Таким образом, выявлены альтернативные состояния хромосомных VNTR-маркеров у штаммов с отличающимся фенотипом, ассоциированным с вирулентностью. Установлено, что определенный MLVA-генотип штаммов может коррелировать с комплексом ассоциированных с патогенностью свойств возбудителя сибирской язвы, присущим всем атипичным штаммам, независимо от места и метода их выделения. Полученные результаты свидетельствуют о значительной перестройке генома *B. anthracis* у таких штаммов. Механизм и сущность этой реорганизации не ясны, как и значение для возможности альтернативного пути размножения микроба в почве. Недавно представлены свидетельства более динамичного, чем ранее представлялось, жизненного цикла *B. anthracis*, в котором взаимодействия с бактериофагами вызывают фенотипические изменения у сибиреязвенного микроба и появление лизогенных производных с резко возросшими возможностями для выживания во внешней среде [15]. В этой связи перспективным представляется изучение не только особенностей экспрессии и вариабельности нуклеотидной последовательности генов, связанных с вирулентностью, у типичных и атипичных штаммов, но и состояния лизогении.

Исследования поддержаны грантом РФФИ (проект № 08-04-000895).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Цыганкова О.И., Еременко Е.И., Рязанова А.Г., Цыганкова Е.А. Мультиплексная амплификационная тест-система для идентификации и дифференциации *Bacillus anthracis*. Журн. микробиол., эпидемиол. и микробиол. 2005; 3:69–74.
2. Цыганкова О.И., Еременко Е.И., Рязанова А.Г. Новые праймеры к последовательности гена *ger X* и их применение для характеристики штаммов *Bacillus anthracis*. В кн.: Актуальные проблемы эпидемиологической безопасности: Матер. юбил. науч.-практ. конф. Ставрополь; 2002. С. 295–6.
3. Цыганкова О.И., Еременко Е.И., Брюханов А.Ф. и др. Генотипирование штаммов сибиреязвенного микроба на территории стран СНГ. Журн. микробиол., эпидемиол. и микробиол. 2003; 6(прил.):51–6.
4. Цыганкова Е.А., Еременко Е.И., Цыганкова О.И., Рязанова А.Г. Полиморфизм гена протективного антигена у вариантов штаммов *B. anthracis*, обнаруживаемый методом PCR-RFLP-анализа. В кн.: Современные технологии в реализации глобальной стратегии борьбы с инфекционными болезнями на территории стран-участников Содружества Независимых Государств: Матер. IX Науч.-практ. конф.; 2 октября 2008; Волгоград. Волгоград; 2008. С. 149–50.
5. Dwyer K.G., Lamonic J.M., Schumacher J.A. et al. Identification of *Bacillus anthracis* specific chromosomal sequences by suppressive subtractive hybridization. BMC Genomics. 2004; 5:15.
6. Easterday W.R., Van Ert M.N., Simonson T.S. et al. Use of

single nucleotide polymorphisms in the *plcR* gene for specific identification of *B. anthracis*. J. Clin. Microbiol. 2005; 43(4):1995–7.

7. Eremenko E.I., Tsygankova O.I., Tsygankova E.A., Ryzanova A.G. Molecular diversity of *Bacillus anthracis* wild and laboratory strains. In: International Conference on *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, and *B. thuringiensis* «*Bacillus* – ACT 2007». Oslo, Norway; 2007; 60 (poster 1).
8. Guidi-Rontani C., Duflo E., Ruffie S. et al. Identification and characterization of a germination operon on the chromosome of *Bacillus anthracis*. Direct submission, submitted (02-SEP-1999). GenBankACCESSION AF182371.
9. Guttman D.M., Ellar D.J. Phenotypic and genotypic comparisons of 23 strains from the *Bacillus cereus* complex for selection of known and putative *B. thuringiensis* virulence factors. FEMS Microbiol. Lett. 2000; 188:7–13.
10. Keim P., Price L.B., Klevytska A.M. et al. Multiple locus variable number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *B. anthracis*. J. Bacteriol. 2000; 182(10):2928–36.
11. Le Fleche P., Hauck Y., Onieniente L. et al. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *B. anthracis*. BMC Microbiology. 2001; 1(1):2.
12. Qi Y., Patra G., Liang X. et al. Utilization of the *rpoB* gene as a specific chromosomal marker for real-time PCR detection of *Bacillus anthracis*. Appl. Environ. Microbiol. 2001; 67:3720–27.
13. Ramisse V., Patra G., Garringue H. et al. Identification and characterization of *Bacillus anthracis* by multiplex PCR analysis of sequences on plasmids pXO1 and pXO2 and chromosomal DNA. FEMS Microbiol. Lett. 1996; 145:9–16.
14. Shannon J.G., Ross C.L., Koehler T.M., Rest R.F. Characterization of anthrolysin O, the *Bacillus anthracis* cholesterol-dependent cytolysin. Infect. Immun. 2003; 71(6):3183–89.
15. Schuch R., Fischetti V.A. The Secret Life of the Anthrax Agent *Bacillus anthracis*: Bacteriophage-Mediated Ecological Adaptations. PLoS ONE 4(8): e6532. doi: 10.1371/journal.pone.0006532.

E.I.Eremenko, A.G.Ryzanova, E.A.Tsygankova, O.I.Tsygankova, A.N.Kulichenko

Genotypic Peculiarities of *Bacillus anthracis* Strains with Different Manifestation of Pathogenicity-Associated Features

Stavropol Research Anti-Plague Institute

The set of *Bacillus anthracis* strains and their derivatives with distinct virulence was selected. The strains were characterized as regards phenotypic properties, VNTR-, SNP- and SNR-loci, plasmid composition, genes of toxin and capsule production, and some pathogenicity-related loci. Correlation between certain MLVA-genotype and a set of phenotypic properties indicative of the strains with altered virulence was revealed.

Key words: *B. anthracis*, strains of anthrax agent, phenotypic properties, VNTR-, SNP-,SNR-loci.

Об авторах:

Еременко Е.И., Рязанова А.Г., Цыганкова Е.А., Цыганкова О.И., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: anthraxlab@mail.ru

Authors:

Eremenko E.I., Ryzanova A.G., Tsygankova E.A., Tsygankova, Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 355035, Stavropol, Sovetskaya St., 13–15. E-mail: anthraxlab@mail.ru

Поступила 12.01.10.