

Н.А.Шишкова, А.Н.Мокриевич, М.Е.Платонов, Т.Э.Светоч, Л.И.Маринин

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ШТАММОВ СИБИРЕЯЗВЕННОГО МИКРОБА ИЗ КОЛЛЕКЦИИ ГНЦ ПМБ

ФГУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболensk

В работе представлены данные по VNTR – типированию сибиреязвенных штаммов из коллекции ГНЦ ПМБ. Всего проанализировано 25 штаммов *Bacillus anthracis*, имеющих разное происхождение и территориальную принадлежность. Использование схемы типирования по P.Keim *et al.* позволило соотнести российские штаммы со штаммами других коллекций. Было обнаружено 4 новых аллели: Dakkar – VtrA (296), 157 – VtrB2 (180), Dakkar – VtrC2 (478) и M-29 – pXO1 (138). Большая часть штаммов относится к группе А (величина VtrB1 фрагмента равна 229 п.о.) и лишь два штамма (1051 и 157) имеют величину VtrB1 фрагмента 256 п.н. Не укладываются ни в один из 89 описанных P.Keim *et al.* генотипов следующие штаммы из коллекции ГНЦ ПМБ: 1 «Коломна», Ч-7, 15, М-29, 34, 81/1, 157, 228, 1051 и Dakkar. Показано генетическое разнообразие сибиреязвенных штаммов, выделенных из разных источников и находящихся в коллекции ГНЦ ПМБ.

Ключевые слова: *B. anthracis*, типирование, штамм, геном.

Bacillus anthracis представляет собой вид бацилл с исключительно мономорфным геномом. Только в середине 90-х американским исследователям [2] удалось обнаружить в геноме *B. anthracis* открытую рамку считывания (ОРФ) vtrA, которая содержала различное число tandemно расположенных повторяющихся последовательностей в зависимости от исследуемого генома (от 2 до 6). Предварительные данные по генетической вариативности штаммов сибиреязвенного микроба P.J.Jackson *et al.* [3] получили, используя систему анализа по одному вариативному локусу vtrA. Авторы обнаружили 5 аллелей этого локуса с размерами ампликонов от 142 до 190 пар оснований.

Основные исследования по типированию штаммов сибиреязвенного микроба были проведены P.Keim *et al.* [4, 5]. Первоначально применительно к сибиреязвенному микробу был адаптирован метод определения полиморфизма длины амплифицированных фрагментов. С помощью метода анализа полиморфизма длины вариативных фрагментов в геноме *B. anthracis* было обнаружено еще семь вариативных фрагментов ДНК, которые могут быть идентифицированы с помощью ПЦР-анализа [4]. Благодаря значительному разнообразию VNTR-

последовательностей, VNTR-анализ обладает большой разрешающей способностью по сравнению с другими системами молекулярного типирования. P.Keim *et al.* [5] разработали систему многолокусного анализа вариативных tandemных повторов (MLVA – Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis), позволяющую дифференцировать штаммы *B. anthracis* по восьми маркерным локусам.

В табл. 1 представлены результаты сравнения величин фрагментов вариативных областей генома сибиреязвенного микроба. Детальный анализ 426 сибиреязвенных штаммов показал, что ПЦР фрагменты, синтезирующиеся с помощью этих праймеров, варьировали в широких пределах и составили для vtrA 289–337 нуклеотидов ($\Delta = 48$); vtrB1 184–256 ($\Delta = 72$); vtrB2 153–171 ($\Delta = 18$); vtrC1 400–685 ($\Delta = 285$); vtrC2 532–607 ($\Delta = 75$); cg3 153–158 ($\Delta = 5$); pXO1 117–141 ($\Delta = 24$); pXO2 135–155 ($\Delta = 20$). Исходя из представленных P.Keim *et al.* данных, все изученные штаммы *B. anthracis* можно условно подразделить на 4 группы.

В первую группу входят штаммы, имеющие величину vtrA фрагментов преимущественно 313 нуклеотидов, vtrB1 – 229 нуклеотидов, vtrB2 – 162 нуклеотида, vtrC1 – 613 нуклеотидов, vtrC2 – 604 нуклеотида,

Таблица 1

Величины фрагментов вариативных областей генома *B. anthracis* (по P.Keim)

vtrA	vtrB1	vtrB2	vtrC1	vtrC2	cg3	pXO1	pXO2
289	184	153	400	532	153	117	135
301	193	162	502	604	158	120	137
313	220	171	520	607		123	139
325	229		538			126	141
337	256		583			129	143
			613			132	145
			685			135	147
						141	149
							155

cg3 – 153 нуклеотида, величины фрагментов pXO1 и pXO2 колеблются в значительных пределах.

Во вторую группу включены штаммы, практически все имеющие величину фрагмента vtrA 313 нуклеотидов, vtrB1 – преимущественно 229 нуклеотидов, vtrB2 – 162 нуклеотида, vtrC1 – 613 нуклеотидов, но vtrC2 фрагменты в этой группе штаммов уже имеют величину 532 нуклеотида и cg3 фрагменты – 158 нуклеотидов, величины фрагментов pXO1 и pXO2 также колеблются.

В третью группу входят штаммы, имеющие величину vtrA фрагмента 313 нуклеотидов, vtrB1 – 229 нуклеотидов, vtrB2 – 162 нуклеотида, но vtrC1 фрагменты уже имеют величину 538 нуклеотидов, vtrC2 – 604 нуклеотида, cg3 – 158 нуклеотидов, величины фрагментов pXO1 и pXO2 значительно колеблются.

В четвертую группу входят штаммы, имеющие низкую величину vtrA фрагмента – 301 нуклеотид, vtrB1 фрагмент варьирует в этой группе от 184 до 256 нуклеотидов, vtrB2 – в основном 171 нуклеотид, vtrC1 – 583 нуклеотида, vtrC2 – 532 нуклеотида, cg3 – 158 нуклеотидов, размеры pXO1 и pXO2 фрагментов колеблются.

При исследовании с помощью MLVA штаммов *B. anthracis* со всего мира (за исключением России) было выявлено 89 генотипов, которые образуют шесть больших групп, представляющих все мировое разнообразие генотипов *B. anthracis*. При этом было выявлено, что одни генотипы имеют широкое распространение по всему миру, в то время как другие ассоциированы с определенными географическими регионами. P.Keim *et al.* [5] исследовали только один штамм российского происхождения – СТИ-1. Отсутствие восьмого маркерного локуса, ассоциированного с плазмидой pXO2, не дало возможности американским ученым отнести этот штамм к какому-либо из 89 генотипов, но было четко доказано, что он относится к подгруппе A1.a.

Как следует из краткого обзора, штаммы многих географических ареалов уже исследованы по представленной схеме с целью изучения их генетического разнообразия. Детальный анализ полной картины полиморфизма фрагментов позволил нам соотнести российские штаммы со штаммами других коллекций. Учитывая вышеизложенное, нами была проведена аналогичная работа по MLVA-генотипированию штаммов *B. anthracis* из коллекции ГНЦ ПМБ.

Материалы и методы

Штаммы. В работе использовали сибирезвенные штаммы *B. anthracis* из коллекции ГНЦ ПМБ. Штаммы выделены из различных источников в разных регионах России и за рубежом. Перечень штаммов приведен в табл. 2. Тотальную ДНК из исследуемых штаммов выделяли методом фенольной экстракции.

Праймеры для MLVA были синтезированы на фирме Amersham Pharmacia Biotech в соответствии с последовательностями, приведенными в работе

P.Keim *et al.* [5]. Все обратные праймеры несут на 5'-конце флуоресцентную метку Cy5 для использования в автоматическом секвенаторе ALFexpress II фирмы Amersham Pharmacia Biotech. При клонировании ампликонов в векторе pUC19 использовали немеченые праймеры, синтезированные фирмой «Литех». Эти же праймеры для подготовки фрагментов ДНК для секвенирования были синтезированы фирмой «Литех».

ПЦР проводили с использованием набора Ready-to-go-Beads фирмы Amersham Pharmacia Biotech на термоциклере Терцик (Москва) по следующей программе: предварительная денатурация – 95 °C, 5 мин; далее 35 циклов: денатурация – 95 °C, 30 с, отжиг – 60 °C, 30 с, элонгация – 72 °C, 1 мин; заключительная элонгация – 72 °C, 5 мин.

Количество матричной ДНК составляло 1 нг, конечная концентрация праймеров – 0,2–0,4 мкМ. Для определения нуклеотидных последовательностей vtr-областей ПЦР-ампликоны клонировали в векторе pUC19 и секвенировали с праймеров M13 с использованием ALFexpress™AutoRead™Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech). Определение нуклеотидных последовательностей и размеров фрагментов проводили на автоматическом секвенаторе ALFexpressII фирмы Amersham Pharmacia Biotech в соответствии с инструкцией фирмы-изготовителя.

Продукты MLVA PCR анализировали электрофорезом на автоматическом флуоресцентном ДНК секвенаторе ALFexpress II. Каждая реакционная смесь анализировалась отдельно. В качестве внешних стандартов использовали коммерческие маркеры молекулярных масс: ALFexpress™Sizer™ 50, ALFexpress™Sizer™ 150, ALFexpress™Sizer™ 200, ALFexpress™Sizer™ 250, ALFexpress™Sizer™ 300, ALFexpress™Sizer™ 50-500, ALFexpress™Sizer™ 600-1600 фирмы Amersham Pharmacia Biotech и смесь семи ампликонов VNTR локусов штамма Ч-7 (pXO2 – 137 bp; CG3 – 153 bp; VtrB2 – 162 bp; VtrB1 – 229 bp; VtrA – 314 bp; VtrC2 – 532 bp; VtrC1 – 613 bp), названную нами Ext std H7. Для анализа использовали программное обеспечение ALFwin™Fragment Analyser 1.00 фирмы Amersham Pharmacia Biotech. Детекцию пиков проводили при следующих установочных параметрах (settings): peak shape – 10; min height – 1,0; baseline type – minima detection; sensitivity – 100.

Для анализа гомологии нуклеотидных последовательностей использовали алгоритм AlignX программы Vector NTI.

Кластерный анализ проводили при помощи программы START (Sequence Type Analysis and Recombinational Tests) (версия 1.0.8) методом парного невзвешенного кластирования с арифметическим усреднением - UPGMA (от англ. Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) [6].

Результаты и обсуждение

Результаты по определению величин фрагментов vtr областей сибирезвенных штаммов из коллекции

Величины фрагментов *vrr* областей штаммов *B. anthracis* из коллекции ГНЦ ПМБ

№	Штамм. Источник.	Размеры <i>Vrr</i> фрагментов, п.н.							
		<i>VrrA</i>	<i>VrrB1</i>	<i>VrrB2</i>	<i>VrrC1</i>	<i>VrrC2</i>	<i>Cg3</i>	<i>PXO1</i>	<i>PXO2</i>
1	1«Коломна». Труп коровы. Московская область	325	229	162	616	601	153	135	137
2	5«Тула». Корова. Тульская область	325	229	162	613	601	153	136	135
3	7(992). Труп коровы. Новгородская область	313	229	162	613	601	153	136	135
4	Ч-7(54). Труп человека	314	229	162	613	532	153	135	137
5	8 (2099). Труп коровы. Татарстан	325	229	162	613	601	153	135	137
6	10«Калуга». Труп коровы. Калужская область	313	229	162	613	601	158	136	137
7	11(1940). Труп яка. Таджикистан	313	229	162	538	601	158	132	137
8	15(1345). Труп коровы. Таджикистан	313	229	162	538	601	153	130	137
9	М-29(№ 1). Больной человек. Саратовская область	313	229	162	613	601	153	138*	137
10	32(603). Корова. Казахстан	313	229	162	-	532	158	133	135
11	34(738). Труп коровы. Казахстан	313	229	162	583	532	153	132	135
12	35(1529). Труп коровы. Чувашия	313	229	162	613	601	153	134	135
13	61(1017). Корова. Кокчетавская область	313	229	162	613	601	153	138	135
14	71/12. 2-я вакцина Ценковского	313	229	162	613	532	153	135	135
15	81(638). Труп овцы. Казахстан	313	229	162	613	601	153	135	135
16	81/1. Больной человек. Ставропольский край	314	229	162	613	604	153	135	137
17	157(Б-1107). Труп коровы. Эстония	301	256	180*	583	532	158	138	137
18	173(2-668). Труп человека. Свердловск	313	229	162	613	532	153	135	137
19	174(3-706). Труп человека. Свердловск	313	229	162	613	532	153	135	137
20	174/3V. Вариант штамма 174	313	229	162	613	601	153	139	137
21	228. Труп овцы. Табахмельский биоккомбинат	325	229	162	583	532	153	127	137
22	И-271. Труп оленя. Ямало-Ненецкий округ	313	229	162	583	532	158	130	147
23	И-272. Труп оленя. Ямало-Ненецкий округ	313	229	162	583	532	158	130	147
24	1051/35. Труп лошади. Уфа	301	256	162	583	532	158	127	137
25	Dakkar	296*	229	162	496	478*	158	134	145

* Новые локусы.

ГНЦ ПМБ представлены в табл. 2.

В качестве контрольных были отобраны 3 штамма – 1«Коломна», Ч-7, 81/1. Для них провели полный сиквенс всех восьми маркерных локусов. Величины фрагментов *vrr* областей данных штаммов, определенные на основании сиквенса, представлены в табл. 3.

Для уточнения размеров новых аллелей, которые отличаются от описанных Р.Keim et al., выполнено секвенирование отдельных ПЦР-ампликонов.

VrrA-локус. На рис. 1 приведены данные сиквенса последовательности *VrrA*-локуса у штаммов Ames, Ч-7 и Dakkar.

Согласно данным Р.Keim et al. [5], *VrrA* фрагмент *B. anthracis* имеет 5 аллелей и последовательность, состоящую из 12 нуклеотидов, которая может повторяться у разных штаммов до 6 раз. Из пред-

ставленных результатов следует, что в случае штамма Dakkar обнаружена новая аллель *VrrA* фрагмента, содержащая 3 повтора.

VrrB1-локус. По данным Р.Keim et al. [5], *VrrB1* фрагмент *B. anthracis* имеет 5 аллелей и последовательность, состоящую из 12 нуклеотидов, которая может повторяться у разных штаммов от 12 до 20 раз. В нашей коллекции представлены 2 аллели из 5 возможных – это 229 и 256 нуклеотидов, содержащие 17 и 20 повторяющихся последовательностей.

VrrB2-локус. Ниже приведены данные сиквенса последовательности *VrrB2*-локуса у штамма 157. Жирным шрифтом выделены прямой и обратный праймеры.

157 – *VrrB2* – 180

CACAGGCTATTCTTTATCAAACAT CATCAAGGT

CACCAAGGC CACCATGAT CATCACGGT CACCACGGT CATCAAGGC

CACCACGGT CAACACAGT CAACAGCAC CAACAGCAC CAACAATAT

CAACAATAT CAACAATAT CAACAATAT CAACAATAT CAACAACAA

TCTTCACCTTGGG

Согласно данным Р.Keim et al. [5], *VrrB2* фрагмент *B. anthracis* имеет 3 аллели и последователь-

Таблица 3

Величины фрагментов *vrr* областей штаммов *B. anthracis* из коллекции ГНЦ ПМБ, определенные на основании сиквенса

Штамм	<i>VrrA</i>	<i>VrrB1</i>	<i>VrrB2</i>	<i>VrrC1</i>	<i>VrrC2</i>	<i>Cg3</i>	<i>PXO1</i>	<i>PXO2</i>
1«Коломна»	325	229	162	616	601	153	135	137
Ч-7	314	229	162	613	532	153	135	137
81/1	314	229	162	613	604	153	135	137

VrrA Ames	(1)	CACAACTACCACCGATGGCACAAAAAAGAAAGGGTTCCTTGCTAAACTC	(50)
VrrA H-7	(1)	CACAACTACCACCGATGGCACAAAAAAGAAAGGGTTCCTTGCTAAACTC	(50)
VrrA Dakkar	(1)	CACAACTACCACCGATGGCACAAAAAAGAAAGGGTTCCTTGCTAAACTC	(50)
Consensus	(1)	CACAACTACCACCGATGGCACAAAAAAGAAAGGGTTCCTTGCTAAACTC	(50)
VrrA Ames	(51)	TTTAAAAAACACGATCCAACCGAACCTTTTATGCAAATGGTTCCGCCCTTA	(100)
VrrA H-7	(51)	TTTAAAAAACACGATCCAACCGAACCTTTTATGCAAATGGTTCCGCCCTTA	(100)
VrrA Dakkar	(51)	TTTAAAAAACACGATCCAACCGAACCTTTTATGCAAATGGTTCCGCCCTTA	(100)
Consensus	(51)	TTTAAAAAACACGATCCAACCGAACCTTTTATGCAAATGGTTCCGCCCTTA	(100)
VrrA Ames	(101)	TCGACAAATGGAAGGACCACCGCCAATGATGCACCAACAACAGCAACCGC	(150)
VrrA H-7	(101)	TCGACAAATGGAAGGACCACCGCCAATGATGCACCAACAACAGCAACCGC	(150)
VrrA Dakkar	(100)	TCGACAAATGGAAGGACCACCGCCAATGATGCACCAACAAC-----CGC	(150)
Consensus	(101)	TCGACAAATGGAAGGACCACCGCCAATGATGCACCAACAACAGCAACCGC	(150)
VrrA Ames	(151)	CACCCCAATATCGACAGCAATATCAACAACAATATCAACAACAATATCAA	(200)
VrrA H-7	(151)	CACCCCAATATCGACAGCAATATCAACAACAATATCAACAACAATATCAA	(200)
VrrA Dakkar	(144)	CACCCCAATATCGACAGCAATATCAACAACAATATCAACAACAATATCAA	(200)
Consensus	(151)	CACCCCAATATCGACAGCAATATCAACAACAATATCAACAACAATATCAA	(200)
VrrA Ames	(201)	CAACAATATCAACAACAATATCCGCAACAATATCAGCAATATCAACCAAC	(250)
VrrA H-7	(201)	CAACAATATCAACAACAATATCCGCAACAATATCAGCAATATCAACCAAC	(250)
VrrA Dakkar	(194)	CAA-----CAATATCCGCAACAATATCAGCAATATCAACCAAC	(250)
Consensus	(201)	CAACAATATCAACAACAATATCCGCAACAATATCAGCAATATCAACCAAC	(250)
VrrA Ames	(251)	ATACATGCAGCATCATCCGAGCAAATGATCCCCTCTC-AAAATGTATGAA	(300)
VrrA H-7	(251)	ATACATGCAGCATCATCCGAGCAAATGATCCCCTCTC-AAAATGTATGAA	(300)
VrrA Dakkar	(232)	ATACATGCAGCATCATCCGAGCAAATGATCCCCTCTC-AAAATGTATGAA	(300)
Consensus	(251)	ATACATGCAGCATCATCCGAGCAAATGATCCCCTCTC-AAAATGTATGAA	(300)
VrrA Ames	(301)	TCAAACGAAACGCGC	(315)
VrrA H-7	(301)	TCAAACGAAACGCGC	(315)
VrrA Dakkar	(301)	TCAAACGAAACGCGC	(315)
Consensus	(301)	TCAAACGAAACGCGC	(315)

Рис. 1. Сиквенс последовательности VrrA-локуса у штаммов Ames, Ч-7 и Dakkar:

«-» – нуклеотид отсутствует, серым выделены полиморфные сайты

ность, состоящую из 9 нуклеотидов, которая может повторяться у разных штаммов от 13 до 15 раз. В нашей коллекции представлены штаммы, величина VrrB2 фрагмента у которых составляет 162 нуклеотида (практически у 100 % штаммов), и лишь у одного штамма 157 выявлен VrrB2 фрагмент величиной 180 нуклеотидов, содержащий 16 повторов, эта аллель не обнаружена Р.Keim *et al.*

VrrC1-локус. По данным Р.Keim *et al.* [5], VrrC1 фрагмент *B. anthracis* имеет 7 аллелей и последовательность, состоящую из 36 нуклеотидов, которая может повторяться у разных штаммов до 12 раз. В нашей коллекции представлены 4 из 7 аллелей – 500, 538, 583 и 613 нуклеотидов. Результаты сиквенса VrrC1 фрагмента штамма 1«Коломна» из нашей коллекции показали, что данный штамм имеет вставку ААА в консервативной области.

VrrC2-локус. Ниже приведены данные сиквенса последовательности VrrC2-локуса у штамма Dakkar. Жирным шрифтом выделены прямой и обратный праймеры.

Dakkar – VrrC2 – 478

CCAGAAGAAGTGGAACTGTAGCAC

TTGAGGAAATGCAACAAGAAATGGTGTAAATGAAGCAATTGAAC

AAAAGAATGAATTCATACATGTTGCTGAGGCTGATGAACAAACGA
AAAAAGATGTTCAAAGCTTTGCGGATGTTTT
AATTGCAGAAGAACAATC GGTTGTAGAGGAAACACC
GGTCGTAGAAGAACAATC
AGTTGTAGAGGAAGCACC GATTGCAGAAGAACAACG
AGTTGTAGAGGAAACACC
GGTCGTAGAAGAACAATC AGTTGTAGAGGAAGCACC
GATTGCAGAAGAACAGTC
AGTTGTAGAGGAAACACC GGTCGTAGAAGAACAATC
AGTTGTAGAAGAGCACC
TGCTGTAGAAGACCAACC AGTTGTGCAAAAAGAAGA
ACCAAAACGTGAGAAAAAGCGTCACGTACCATTTAATG TTGTTAT
GTTGAAACAA
GATAGAGCGCGATTAATGGAAAGAC

Согласно данным Р.Keim *et al.* [5], VrrC2 фрагмент *B. anthracis* имеет 3 аллели и последовательность, состоящую из 18 нуклеотидов, которая может повторяться у разных штаммов до 21 раза. Из представленных результатов следует, что в случае штамма Dakkar обнаружена новая аллель VrrC2 фрагмента, содержащая 14 повторов.

CG3-локус. По данным Р.Keim *et al.* [5], CG3 фрагмент *B. anthracis* имеет 2 аллели с величиной

153 и 158 нуклеотидов. В нашей коллекции в основном представлены штаммы с величиной CG3 фрагмента в 153 нуклеотида.

pXO1-фрагмент. Ниже приведены данные секвенса последовательности pXO1 у штамма М-29 (№ 1). Жирным шрифтом выделены прямой и обратный праймеры.

М-29 (№ 1) – pXO1 – 138

CAATTATGTAACGATCAGATTAAAGTTCA

TTATTAACSTACATAAGTAATGTATTAATAATTTTCAAATGGATT

AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT

AACGGGACCAGCCATTATGAAGCAACTAATTCTAGA

Согласно данным P.Keim *et al.* [5], pXO1 фрагмент *B. anthracis* имеет 8 аллелей и последовательность, состоящую из 3 нуклеотидов (AAT), которая может повторяться у разных штаммов от 3 до 11 раз. Из представленных результатов следует, что у штамма М-29 (№ 1) обнаружена новая аллель pXO1 фрагмента, содержащая 10 повторов AAT.

pXO2-фрагмент. Далее приведены данные секвенса последовательности pXO2 у штамма И-272. Жирным шрифтом выделены прямой и обратный праймеры.

И-272 – pXO2 – 145

TCATCCTCTTTAAGTCTTGGGT

TATATTTATCTACCTTTGCGGTATGTGAAATT

AT AT AT AT AT AT AT AT AT AT AT

CAAAAGAAAAAAGGAAGGGGAATACCCCTCTTACTTGTAC
TTT

TGTCGTCGGAGTTCATCACAC

По данным P.Keim *et al.* [5], pXO2 фрагмент *B. anthracis* имеет 9 аллелей и последовательность, состоящую из 2 нуклеотидов (AT), которая может повторяться у разных штаммов от 3 до 11 раз. Большинство представленных в коллекции ГНЦ ПМБ штаммов по величине pXO2 фрагмента относятся к одному типу и имеют величину pXO2 фрагмента 135 нуклеотидов, содержащую 7 AT повторов. Обнаружен также штамм с 11 AT повторами – штамм И-272.

Всего было проанализировано 25 штаммов *B. anthracis* из коллекции ГНЦ ПМБ. При этом было обнаружено 4 новых аллели: Dakkar – VtrA (296), 157 – VtrB2 (180), Dakkar – VtrC2 (478) и М-29 (№ 1) – pXO1 (138).

В ходе исследований фрагментов ДНК выяснено, что большая часть штаммов относится к А группе – величина VtrB1 фрагмента равна 229 п.н., и лишь два штамма – 1051/35 и 157, имеющие величину VtrB1 фрагмента равную 256 п.н., можно отнести к группе В. К подгруппе А1.а относятся штаммы 1«Коломна», 5«Тула», 7 (992), 8 (2099), 10«Калуга», М-29 (№ 1), 35 (1529), 61 (1017), 81 (638) и 174/3V. К подгруппе А3.а относятся штаммы 71/12, 173 (2-668) и 174(3-706). К подгруппе А3.в относятся штаммы И-271 и И-272. К группе А4 относится штамм 11 (1940). Не укладываются ни в один из 89 описанных

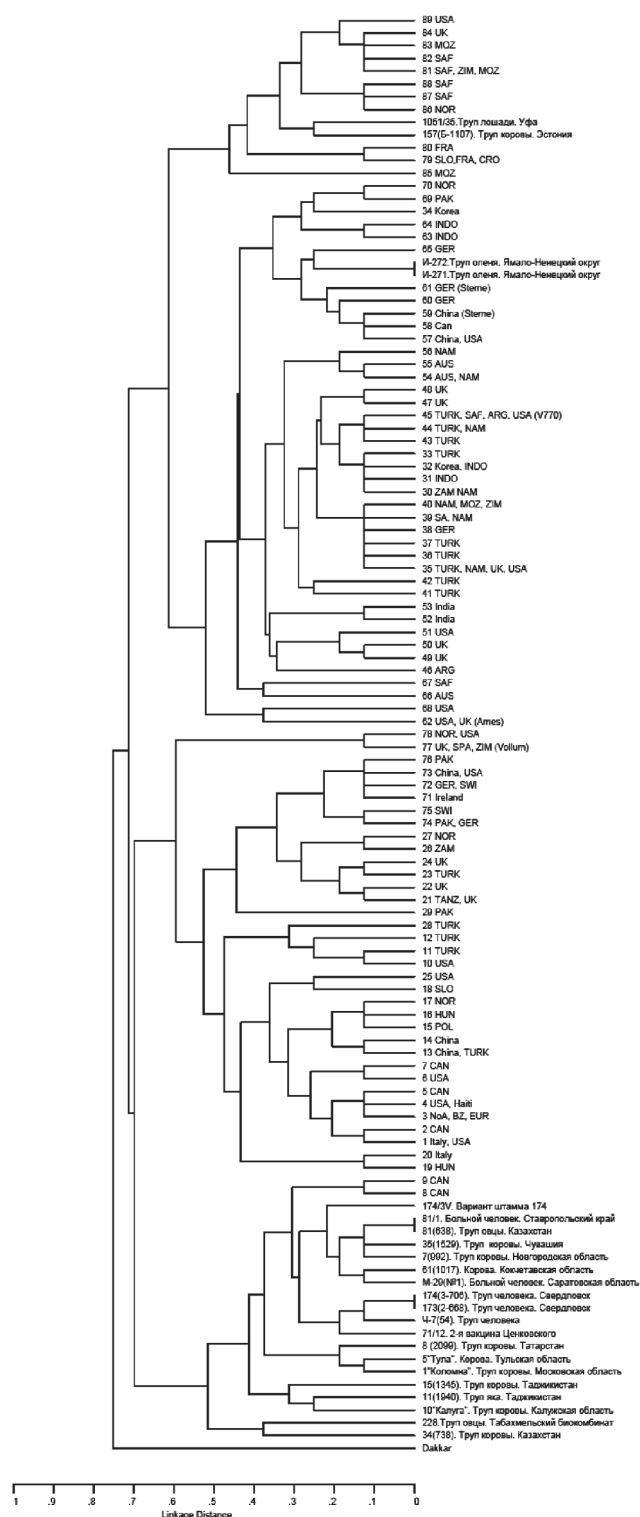


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное с помощью алгоритма UPGMA на основании результатов P.Keim *et al.* [5] и полученных в данной работе. Штамм 32(603) не использовался для построения дерева, т.к. у него отсутствует VtrC1-локус

P.Keim генотипов следующие штаммы из коллекции ГНЦ ПМБ: 1, Ч-7, 15 (1345), М-29 (№ 1), 34 (738), 81/1, 157, 228, 1051/35 и Dakkar.

Штамм Ч-7 по локусу CG3 является типичным представителем подгруппы А1.а, т.к. имеет аллель CG3-153, которая, согласно данным P.Keim *et al.* [4],

является определяющим диагностическим маркером для подгруппы A1.a. Однако аллель 532 локуса VrrC2 не встречается ни у одного представителя подгруппы A1.a. Таким образом по совокупности всех восьми маркеров штамм Ч-7 не может быть отнесен ни к одному из 89 описанных P.Keim генотипов. Аналогичная картина наблюдается и со штаммами 1«Коломна» и 81/1. Они не могут быть отнесены ни к одному из генотипов подгруппы A1.a по локусу PXO1. Найденные новые аллели также формируют новые генотипы.

VNTR анализ по локусу vrrA показал, что 17 % штаммов составляют VNTR5 категорию, 73 % штаммов относятся к категории VNTR4, и только три штамма (10 %) попадают в категорию VNTR3. Не было выявлено штаммов категорий VNTR2 и VNTR6. Такое распределение подтверждает данные Jackson *et al.* [3] о превалировании VNTR4 типа в мировой коллекции штаммов и совпадает с ранее полученными результатами Е.А.Цыганковой и сотр. [1].

На основании полученных результатов было построено филогенетическое дерево (рис. 2). Несомненно, метод MLVA является одним из наиболее перспективных современных методов генотипирования и применение его для типирования разных штаммов *B. anthracis* позволит значительно расширить представления о генетическом разнообразии возбудителя сибирской язвы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Цыганкова Е.А., Еременко Е.И., Цыганкова О.И. Генетическое разнообразие локуса vrrA у штаммов *Bacillus anthracis*, выделенных на территории стран СНГ. В кн.: Чрезвычайные ситуации международного значения в общественном здравоохранении в решениях Санкт-Петербургского саммита «Группы восьми» и санитарная охрана территорий государств-участников Содружества Независимых Государств. Оболensk; 2006. С. 125–6.
2. Andersen G.L., Simchock J.M., Wilson K.H. Identification of

a region of genetic variability among *Bacillus anthracis* strains and related species. J. Bacteriol. 1996; 178(1):377–84.

3. Jackson P.I., Walters E.A., Kalif A.S., Richmond K.L., Adair D.M., Hill K.K. *et al.* Characterization of the Variable-Number Tandem Repeats in vrr A from different *Bacillus anthracis* isolates. Appl. Environ. Microbiol. 1997; 63(4):1400–5.

4. Keim P., Kalif A., Schupp J., Hill K., Travis S., Richmond K. *et al.* Molecular evolution and diversity in *Bacillus anthracis* as detected by amplified fragment length polymorphism markers. J. Bacteriol. 1997; 179(3):818–24.

5. Keim P., Price L.B., Klevytska A.M., Smith K., Schupp J.M., Okinaka R. *et al.* Multiple-locus VNTR analysis (MLVA) reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. J. Bacteriol. 2000; 182:2928–36.

6. Jolley K.A. *et al.* Sequence type analysis and recombinational tests (START). Bioinformatics. 2001; 17:1230–1.

N.A.Shishkova, A.N.Mokrievich, M.E.Platonov, T.E.Svetoch, L.I.Marinin

Study of the Genetic Diversity of the Anthrax Microbe Strains from the Collection of SRC AMB

State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk

Data on VNTR typing of anthrax strains from SRC AMB collection are presented. 25 *Bacillus anthracis* strains of different origin and isolated in different territories have been analyzed. Application of the typing scheme of P.Keim *et al.* enabled to correlate Russian strains with strains of other collections. 4 new alleles: Dakkar-VrrA(296), 157-VrrB2(180), Dakkar-VrrC2(478) and M-29-pXO1(138) were determined. Major part of the strains refers to the A group (the size of VrrB1 fragment is 229 b.p.) and only two strains (1051 and 157) possess VrrB1 fragment of 229 b.p. The following strains of SRC AMB collection: 1 Kolomna, Ch-7, 15, M-29, 34, 81/1, 157, 228, 1051 and Dakkar do not go in any of 89 genotypes described by P.Keim *et al.* Genetic diversity of the anthrax strains isolated from different sources and presented in SRC AMB collection is shown.

Key words: *B. anthracis*, typing, strain, genome.

Об авторах:

Шишкова Н.А., Мокриевич А.Н., Платонов М.Е., Светоч Т.Э., Маринин Л.И. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Оболensk. E-mail: firstova@obolensk.org

Authors:

Shishkova N.A., Mokrievich A.N., Platonov M.E., Svetoch T.E., Marinin L.I. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk. E-mail: firstova@obolensk.org

Поступила 25.02.10.