

СУЧАСНІ ПІДХОДИ ДО ІНДИКАЦІЇ *BACILLUS ANTHRACIS* У НАВКОЛИШНЬОМУ СЕРЕДОВИЩІ

ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського
НАМН України», Київ

E-mail: vrs1808@gmail.com

В *Bacillus anthracis* – збудник сибірки, який може використовуватися з біотерористичною метою. Ефективна стратегія біозахисту передбачає удосконалення діагностичних досліджень у напрямку підвищення їх чутливості, специфічності та швидкості отримання результатів досліджень. В огляді представлено результати аналізу даних літератури щодо сучасних методів виявлення *Bacillus anthracis* та її спор в об'єктах навколишнього середовища, які мають найбільше епідеміологічне значення, зокрема у повітрі та ґрунті. Звичайні мікробіологічні методи є золотим стандартом для ідентифікації бактерій, але їх обмеження при роботі з *B. anthracis* є необхідністю культивування та роботи з живим особливо-небезпечним патогеном, що пов'язано з ризиком лабораторного інфікування. Натепер для визначення *B. anthracis* розроблено низку нових методів, які дозволяють прискорити процес їх виявлення та є набагато безпечнішими з погляду біозахисту. Насамперед це методи, засновані на ампліфікації ДНК. Секвенування ДНК збудника підвищує специфічність методу, а також дозволяє виявляти рідкісні або нові варіанти *B. anthracis*. Розроблено швидкий метод ідентифікації ДНК *B. anthracis*, виконання якого займає менше години. Водночас використовують імунологічні методи для визначення антигену збудника. Слід зазначити, що специфічна ідентифікація *B. anthracis* залишається складною через його фенотипову та генотипову мінливість з іншими видами *Bacillus*. Для вирішення цієї проблеми був запропонований метод фаготипування, який останнім часом удосконалений за допомогою біотехнологічних методів (конструювання фагу *B. anthracis*) із детекцією його біолюмінесценції. Перспективною технологією для швидкого, високочутливого та специфічного виявлення та ідентифікації *B. anthracis* є біосенсорні методи з використанням портативних пристроїв для їх проведення.

Ключові слова: сибірка, *Bacillus anthracis*, навколишнє середовище, діагностичні дослідження.

V. I. Zadorozhna, V. R. Shahinian

MODERN APPROACHES TO THE INDICATION OF *BACILLUS* *ANTHRACIS* IN THE ENVIRONMENT

State Institution "L. V. Hromashevskiy Institute of Epidemiology and Infectious Diseases
of National Academy of Medical Science of Ukraine", Kyiv

E-mail: vrs1808@gmail.com

В *Bacillus anthracis* – the causative agent of anthrax, which can be used for bioterrorism purposes. An effective biosecurity strategy involves the improvement diagnostics tests for increase its sensitivity and specificity, and the tests for the rapid detection of pathogen. The literature review presents the results of recent methods of detecting *Bacillus anthracis* spores/cells in environmental objects with greatest epidemiological significance – in air and soil. Conventional microbiological methods are the gold standard for bacterial identification, but their limitation is necessity to cultivate and work with a live particularly dangerous pathogen – *B. anthracis*, which is associated with the risk of laboratory infection. Now, a number of new methods have been developed for the indication *B. anthracis*, which allow speed up the process of their detection and are much safer from the point of view of biosecurity. First of all, these are methods based on DNA amplification. Sequencing the DNA of the pathogen adds specificity to the method, and also identifies rare or new variants of *B. anthracis*. A rapid method for the identification of *B. anthracis* DNA, which takes less than an hour, has been developed. Also, immunological methods are used to determine the pathogen's antigen. It should be noted that the specific identification of *B. anthracis* remains difficult due to its phenotypic and genotypic similarity to other *Bacillus* species. To solve this problem, a phage typing method was proposed, which has recently been improved with the help of biotechnological methods (construction of the *B. anthracis* phage) with the detection of its bioluminescence. A promising technology for fast, highly sensitive and specific detection and identification of *B. anthracis* is biosensor methods using portable devices for their implementation.

Key words: anthrax, *Bacillus anthracis*, environment, diagnostic tests.

B*acillus anthracis* – грампозитивна спороутворююча бактерія, що викликає сибірку. Хоча хвороба була достатньо вивчена ще у XIX столітті, інтерес до неї значно відновився протягом останніх двох десятиліть через використання *B. anthracis* з біотерористичною метою восени 2001 р. у США. Летальність при легеневої формі сибірки досягає 90%, що зумовлює високу ймовірність використання спор *B. anthracis* для аерогенного зараження з метою терористичних атак. Можливість використання *B. anthracis* у біотерористичних цілях сприяло розробці чутливих, безпечних та швидких методів індикації.

Серед мікроорганізмів, що можуть бути використані як бактеріологічна зброя, *B. anthracis*, відповідно до визначення CDC, посідає перше місце в категорії А [1]. До цієї категорії також належать: ботулотоксин (токсин *Clostridium botulinum*); збудник чуми (*Yersinia pestis*); збудник віспи (*Variola major*); збудник туляремії (*Francisella tularensis*); певні *Filoviruse* та *Arenaviruses*, які викликають вірусні геморагічні гарячки (віруси Ебола, Марбург, Лааса, Мачупо). Отримання бактерій, які належать до даного списку, не викликає значних труднощів, оскільки вони культивуються на поживних середовищах, що можуть бути виготовлені з дешевих та доступних інгредієнтів. Відповідно до визначень CDC [1], найважливішими ознаками патогенів категорії А є:

можливість легко поширюватися в навколишньому середовищі та передаватися від людини до людини;

захворювання, які вони викликають, мають високі рівні смертності та потенційний серйозний вплив на здоров'я населення;

захворювання можуть викликати суспільну паніку та соціальні збурення;

вимагають спеціальних дій щодо готовності громадського здоров'я.

Важлива властивість, що робить *B. anthracis* «патогеном №1» у цій категорії, зумовлена надзвичайно високою стійкістю спор мікроорганізму в навколишньому середовищі: вони можуть зберігатися в ґрунті десятиліттями, стійкі до високих температур, висушування, дії хімічних речовин, у тому числі до деяких дезінфектантів.

Крім можливості використання *B. anthracis* як бактеріологічної зброї, існує реальний ризик поширення збудника контактним та аліментарним шляхами в ендемічних регіонах. Україна входить до числа ендемічних регіонів із сибірки, водночас кількість зареєстрованих випадків захворювання серед диких та свійських тварин, порівняно з іншими ендемічними країнами європейського регіону, невелика. За період 2007–2022 років в Україні було отримано 28 позитивних результатів досліджень на *B. anthracis* у таких областях: Закарпатська (1), Запорізька (2), Івано-Франківська (1), Тернопільська (1), Одеська (12), Харківська (2), Чернівецька (1), Черкаська (6), Сумська (2) [2]. За цей період було зареєстровано 8 випадків захворювань серед людей. У Миколаївській області – 1 випадок у 2008 р., на Черкащині – 1 випадок у 2012 р., на Одещині – 5 випадків у 2018 році, коли було виявлено вогнище сибірки. У 5 осіб спо-

стерігалися симптоми шкірної форми захворювання, пов'язаної з обробкою туші домашньої тварини, ймовірно хворої. Діагноз «Сибірська виразка» було підтверджено методом ПЛР в одного хворого [3]. У 2020 р. на Одещині був зареєстрований 1 випадок сибірки.

У зв'язку з агресією РФ проти України, особливо в неблагополучних щодо сибірки південно-східних областях, варто враховувати високу ймовірність поширення захворювання внаслідок руйнування скотомогильників. На території України знаходиться понад 13,5 тисячі місць захоронення тварин, які загинули від сибірки [4].

Внаслідок підриву Каховської ГЕС значно зріс ризик попадання спор *B. anthracis* у воду та на пасовища. Всі ці обставини диктують необхідність проведення посиленого лабораторного моніторингу об'єктів довкілля, насамперед ґрунту, кормів для тварин, води на наявність спор *B. anthracis*.

Мета роботи. Огляд даних літератури про сучасний стан методів виявлення збудника сибірки та його спор у навколишньому середовищі.

Застосування традиційних мікробіологічних методів ідентифікації бактерій завжди пов'язано з необхідністю культивування мікроорганізмів. Звичайні методи ідентифікації *B. anthracis* включають ріст на селективних середовищах, відсутність гемолізу, відсутність рухливості, фарбування капсули, лізис гамма-фага та чутливість до пеніциліну – реакцію «перлинного намиста». Звичайні мікробіологічні методи є золотим стандартом для ідентифікації бактерій, але у випадку з *B. anthracis* вони не завжди спрацьовують. Це пов'язано з тим, що багато фенотипових ознак *B. anthracis*, таких як відсутність рухливості, відсутність гемолізу, лізис гамма-фагів і чутливість до пеніциліну, можуть проявлятися також у ізолятів *Bacillus cereus*. З іншого боку були виділені гемолітичні штами *B. anthracis*, а також штами, стійкі до пеніциліну і гамма-фага. Крім того, застосування традиційних мікробіологічних методів вимагає культивування та роботи з живими мікроорганізмами, що пов'язано з ризиком лабораторного інфікування [5].

Натепер для визначення *B. anthracis* розроблено декілька нових методів, які дозволяють прискорити процес їх виявлення та є набагато безпечнішими з погляду біозахисту.

По-перше, це методи, засновані на ампліфікації ДНК. Серед них насамперед треба відмітити ПЛР та ПЛР у реальному часі. Найбільш широко використовувані генетичні маркери для ідентифікації *B. anthracis* розташовані на плазмідах вірулентності pXO1 і pXO2. Зазвичай це гени, що кодують компоненти токсину *B. anthracis* (захисний антиген, фактор набряку, летальний фактор), розташовані на pXO1, і гени, що кодують капсулу, розташовані на pXO2. По-друге, це методи ізотермічної ампліфікації ДНК. Ампліфікація ДНК в ізотермічних умовах є дуже перспективним інструментом, і було описано декілька методів, таких як рекомбіназна полімеразна ампліфікація (recombinase polymerase amplification – RPA), геліказ-залежна ампліфікація (helicase-dependent amplification – HDA), петлева опосередкована ізотермічна ампліфікація (loop-mediated

Передова стаття

isothermal amplification – LAMP), ампліфікація нуклеїнових кислот «по колу, що котиться» (rolling circle amplification – RCA), ізотермічна та химерна ампліфікація нуклеїнових кислот, ініційована праймерами (isothermal and chimeric primer-initiated amplification of nucleic acids – ICAN), ампліфікація із заміщенням ланцюга (strand displacement amplification – SDA), ізотермічна ампліфікація з одним праймером (single primer isothermal amplification – SPIA) і полімеразна спіральна реакція (polymerase spiral reaction – PSR) [5]. Слід відзначити швидкий метод ідентифікації ДНК *B. anthracis*. Його виконання займає трохи більше 40 хвилин. Чутливість методу дозволяє виявляти дві копії ДНК патогенних штамів. Для проведення дослідження використовується портативний прилад, що використовує технологію DETECTR на основі генного редактора CRISPR [6].

Альтернативним підходом для виявлення *B. anthracis* є визначення антигену за допомогою імунологічного аналізу. Було відібрано антитіла до різних антигенів, таких як глікопротеїн BclA, який є основним компонентом екзоспорія спор *B. anthracis*, а також олігосахаридні епітопи BclA, позаклітинний антиген 1 EA1, який є основним компонентом S-шару *B. anthracis*, захисний антиген PA, який є компонентом токсину *B. anthracis* і полі-D-глутамінової капсули. Вибір відповідного цільового антигену для аналізу залежить від типу досліджуваних проб, оскільки різні антигени експонуються на поверхні вегетативних клітин і спор *B. anthracis*. Водночас треба звернути увагу на можливість перехресної реактивності з іншими представниками групи *B. cereus* [5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13].

Розроблено метод виявлення основного біомаркера *B. anthracis* – дикарбонової кислоти за допомогою флюоресценції. Межі виявлення маркера пропонувані методом становлять близько 0,8 мкМ в етанолі та 0,36 мкМ у воді, що набагато нижче за інфекційну для людини дозу спор *B. anthracis* (60 мкМ) [14].

Ще одним підходом до виявлення *B. anthracis* є біосенсорні методи, які розглядаються як перспективна технологія для швидкого, високочутливого і специфічного виявлення та ідентифікації *B. anthracis* із можливістю використання портативних пристроїв як обладнання для їх проведення. Біосенсор містить молекули біологічного розпізнавання, іммобілізовані на перетворювачі сигналу, який перетворює сигнал у вихідний сигнал, що зчитується. За способом передачі сигналу біосенсори можна розділити на електрохімічні (амперометричні, потенціометричні та кондуктометричні), оптичні, п'єзоелектричні та термосенсори. Більшість розроблених біосенсорів для ідентифікації *B. anthracis* засновані на антитілах (імуносенсори) або зондах нуклеїнових кислот (геносенсори) як розпізнавальних молекулах. Час, необхідний для отримання результатів, варіює від декількох хвилин до кількох годин [5, 15].

Отже, нині доступна низка методів, спрямованих на швидке виявлення *B. anthracis* у зразках навколишнього середовища, а також у місцях надання допомоги людям із підозрою на інфікування даним патогеном. Ці технології варіюють від методів на

основі виділення культури мікроорганізму до портативних пристроїв для ампліфікації ДНК та сенсорного дослідження. Однак, незважаючи на значний прогрес у цьому напрямку, специфічна ідентифікація *B. anthracis* все ще залишається складною через його фенотипову та генотипову схожість з іншими видами бактерій роду *Bacillus*. Тому, багато зусиль докладається для підвищення специфічності методів ідентифікації *B. anthracis* [16].

Визначення *B. anthracis* у повітрі. Саме у зв'язку з військовими діями, які можуть супроводжуватися руйнуваннями скотомогильників, та ризиками біотероризму, важливим є визначення спор *B. anthracis* у повітрі, оскільки їх потрапляння через дихальні шляхи призводить до пневмонії з швидким перебігом і високою летальністю. У доступній літературі кількість робіт із описом таких методів дослідження та самих досліджень є обмеженою, а доступ до їх повного тексту зазвичай можливий лише на комерційній основі.

Описано результати дослідження 11 059 проб аерозолі, відібраних Агентством з охорони навколишнього середовища в 11 містах США. Визначали наявність та видовий склад *Bacillus* із використанням гетеродуплексного аналізу на основі ПЛР. За результатами досліджень було диференційовано 3 групи проб: 1-а група містила *B. anthracis* і дуже близькі, часто патогенні, штами *B. cereus* і *Bacillus thuringiensis*; 2-а – інші штами *B. cereus* і *B. thuringiensis*; 3-я – більш віддалено споріднені види бактерій роду *Bacillus*. У 8 із 11 міст виявлено 50% і більше позитивних на інші види *Bacillus spp.* проб, а частка проб аерозолів, що віднесені до 1-ої групи, коливалася від 3% до 32%. У містах східної частини США зазвичай частіше виявляли позитивні проби та ширшу різноманітність видів *Bacillus spp.*, ніж у західній. Позитивні проби виявляли протягом року. За оцінкою авторів, ці результати мають значення для виявлення патогенів у пробах навколишнього середовища, розуміння природної еволюції нових патогенних штамів і частоти інфекцій, спричинених штамми підгрупи *B. cereus* [17]. Дані світової літератури щодо методів визначення спор *B. anthracis* у повітрі були проаналізовані в огляді [18]. За даними дослідників, ефективним виявився метод ПЛР у реальному часі. В експерименті 100 л повітря пропускали через 0,45-мкм нітроцелюлозний мембранний фільтр монітора для аналізу аерозолів (Millipore, Токіо, Японія), після чого суспендували в 1 мл стерильному фосфатно-сольовому буфері та штучно додавали спори *B. anthracis*. Суспензію також нагрівали при 95 °C протягом 15 хв і досліджували в ПЛР у реальному часі з використанням специфічних для збудника сибірки праймерів. Методом ПЛР у реальному часі вдавалося ідентифікувати навіть поодинокі клітини *B. anthracis*. Здебільшого у суспензії, приготуваній на основі фільтрації 100 л повітря, на чашках з NA (Nutrient agar) має бути виявлено 10–1000 бактеріальних клітин. Коли спори *B. anthracis* були штучно внесені в таку суспензію з подальшим розподілом на чашках із BSA (бичачий сироватковий альбумін), спостерігався ріст фонових бактеріальних клітин, але також на чашках виявляли великі шорсткі ко-

лонії, які в подальшому були підтверджені у ПЛР як *B. anthracis*. Автори наголошують на тому, що ПЛР у реальному часі є гнучким і потужним інструментом для виявлення спор *B. anthracis* у повітрі. У попередній своїй роботі ті ж дослідники вказують на аналогічну методику для визначення спор *B. anthracis*, але ще зазначають, що при проведенні ПЛР у реальному часі також використовували систему типу Light Cyler [19].

В іншому дослідженні спори *B. anthracis* у повітрі визначали шляхом відбору проб повітря (вологий режим) і подальшого впливу на відібраний зразок функціоналізованого антитамилами п'єзоелектричного збудженого консольного датчика міліметрового розміру (РЕМС). Використовували комерційний пробовідбірник повітря, проби відбирали протягом 10 хв зі швидкістю 267 л/хв. Спори *B. anthracis* із повітря були сконцентровані у 5 мл фосфатно-сольового буферу (PBS). Потім цей зразок вводили в проточну кювету, що містить датчик РЕМС, функціоналізований антитамилами. Резонансна частота датчика РЕМС на 925,1 кГц зменшувалася експоненціально, оскільки спори, прикріплені до поверхні датчика, продукували позитивну відповідь, що значно перевищувала рівень шуму за 2 хв, і досягала значення стабільного стану за 20 хв. У рідкій фазі відповідь датчика добре корелювала ($R^2=0,99$) з концентрацією спор і було показано наступне: [Відповідь у Гц]=(0,0637) × (концентрація спор у мл). Автори вказують на те, що виявлення 38 спор/л повітря можливе майже в режимі реального часу з орієнтовною нижньою межею виявлення ~5 спор/л повітря [20].

Описано також використання мікрорезонаторних датчиків маси для визначення спор *B. anthracis* як у повітрі, так і у воді [21].

Компанією Idaho Technology, Inc. (ITI), США розроблено систему (RAZOR EX Anthrax Air Detection System) для якісного визначення спор *B. anthracis* в повітрі, сконцентрованих пристроями для забору повітря. Ця система складається з набору для екстракції ДНК, набору з ліофілізованим реагентом для ПЛР та приладу для ПЛР у реальному часі RAZOR EX. Кожен набір розрахований на три аналізи з диференціацією потенційно вірулентних *B. anthracis* від авірулентних та інших видів *Bacillus*. Ці аналізи націлені на плазмиди rXO1 та rXO2 і хромосому ДНК. Коли всі маркери виявлені, прилад видає сигнал «виявлено сибірку», що означає наявність генів вірулентності *B. anthracis*. Автори вказують на те, що система RAZOR є чутливою та специфічною, яка точно ідентифікує *B. anthracis* в аерозольних пробах, зокрема і в присутності сторонніх речовин [22]. Для підтвердження чутливості та специфічності системи RAZOR EX було проведено дослідження щодо виявлення *B. anthracis* в буфері для збору аерозолів. Для цього фосфатно-сольовий буфер був заповнений 1 мг/мл стандартизованого пилу для імітації автентичної аерозольної проби, куди додавали або *B. anthracis* Ames, або *B. cereus* у концентрації 20 000 спор/мл. Усі набори зразків були рандомізовані та закодовані наосліп. Було отримано 144 позитивних результатів із 144 проб із *B. anthracis* (довірчий інтервал 95%,

0,975–1,00) і 0 позитивних результатів із 143 проб із *B. cereus* (довірчий інтервал 95%, 0,00–0,0262). Ці дані відповідають вимогам щодо стандартизації методів для виявлення агентів [23].

Узагальнюючи наведені дані, слід відмітити достатньо обмежену кількість наукових досліджень, спрямованих на визначення спор *B. anthracis* у повітрі. Більшість розробок було проведено протягом першого десятиріччя 2000-х років і, найімовірніше, вони були ініційовані ризиками, пов'язаними з біотерористичними актами на початку 2000-х років у США.

Визначення *B. anthracis* у ґрунті. У природних умовах найбільш значущим резервуаром спор *B. anthracis* є ґрунт. Водночас відносно низька концентрація спор у пробах ґрунту значно ускладнює їх детекцію, відповідно знижується чутливість досліджень. Крім того, наявність у ґрунті значної кількості мікрофлори і різних частинок, може призводити до отримання як хибнопозитивних, так і хибнонегативних результатів. Наприклад, за даними дослідження [24], із 150 зібраних і проаналізованих зразків рутинний культуральний метод дав 10 хибнопозитивних та 19 хибнонегативних результатів, метод ПЛР у реальному часі – 0 хибнопозитивних та 26 хибнонегативних результатів. Тому, незважаючи на розроблені методичні рекомендації щодо індикації збудника, у тому числі й в об'єктах навколишнього середовища [25], методи виділення спор із ґрунту та їх індикації постійно удосконалюються.

Значна увага в усіх існуючих методах приділяється пробопідготовці ґрунту, без чого використання навіть найбільш чутливих методів буде неефективним. Автори огляду, присвяченого аналізу літератури за методами обробки ґрунту для виділення спор збудника, звертають увагу на те, що, незважаючи на існування значної кількості тестів для виявлення спор *B. anthracis*, лише деякі з них можуть бути використані для роботи безпосередньо із зразками ґрунту. Це пов'язано з тим, що для отримання достовірного результату найважливішим етапом є обробка первинного зразка [26]. Теперішні підходи до обробки зразків ґрунту можна розділити на два загальні типи: непрямі та прямі. При непрямому спорі відділяють від частинок ґрунту, наприклад, суспензійним методом із подальшим центрифугуванням, сепарацією, фільтрацією тощо. При прямій обробці зразок ґрунту досліджується культивуванням на селективному агарі *B. anthracis* або методом екстракції ДНК. Прямі та непрямі методи обробки мають відповідні переваги та недоліки.

Крім прямої екстракції ДНК збудника з ґрунту, може застосовуватися попереднє збагачення проби, яке необхідне у разі низької концентрації спор. Додавання до зразка накопичувального середовища дозволяє проростати спорам та сприяє зростанню вегетативних клітин. У міру виснаження поживних речовин спороутворюючі бактерії починають споруляцію, одночасно зменшується частка вегетативних клітин та інших неспоротворних бактерій або вони гинуть. Тривала інкубація і прогрівання використовуються для знищення вегетативних клітин, що залишилися [27].

Передова стаття

Оскільки інші бактерії, присутні в пробах з об'єктів навколишнього середовища, здатні пригнічувати ріст *B. anthracis*, для підвищення ефективності ізоляції *B. anthracis* пропонують використовувати селективні агаризовані середовища, до складу яких входять такі компоненти, як сульфаметоксазол, поліміксин В, лізоцим, динатрієва сіль фосфоміцину, еритроміцину, азитроміцину дигідрат тощо [28].

Оскільки природа геному *B. anthracis* ускладнює його специфічне виявлення через тісну гомологію з іншими представниками *Bacillus spp.*, одним із методів індикації *B. anthracis*, який був запропонований ще 1955 р. В. Д. Тимаковим та Д. М. Гольдфарбом і отримав назву «реакції наростання титру фага», є фаготипування. Він оснований на тому, що штучно введений у досліджуваній субстрат гомологічний бактеріофаг у певній концентрації з коротким циклом внутрішньоклітинного розвитку адсорбується та розмножується. Подальше збільшення концентрації (підвищення титру) вільного позаклітинного фага, порівняно з контролем, свідчить про присутність у досліджуваному матеріалі гомологічного збудника. Цей метод нині було вдосконалено. Було використано сконструйований фаг *B. anthracis* (Wβ::luxAB-2) із детекцією його біолюмінесценції. Важливо, що сконструйований фаг генерував біолюмінесцентний сигнал тільки в активних клітинах, що має особливе значення для дослідження довкілля з метою оцінки необхідності деконтамінації. Метод також включав використання напівселективного середовища, що містить антибіотик, ген резистентності до якого був використаний для селекції фагів. Таким чином, усі інфіковані фагом бактерії *B. anthracis* мали конкурентну перевагу росту в такому середовищі. Метод дозволяв виявляти 10^4 КУО/мл за 6 годин [29]. За думкою авторів, метод може впевнено конкурувати із ПЛР як за чутливістю, так і за простотою виконання і детекції результатів.

Водночас дотепер золотим стандартом виявлення та кількісного визначення *B. anthracis* у пробах з довкілля вважаються методи, спрямовані на виявлення нуклеїнових кислот збудника [30, 31]. За допомогою гніздової ПЛР та ПЛР у реальному часі вдається виявити навіть одну клітину *B. anthracis* в 1 г ґрунту. Використання сучасних молекулярно-генетичних методів дозволяє не лише провести ідентифікацію штамів цього збудника, виділених із ґрунту, а й здійснювати порівняльний аналіз їх геномів. Зокрема, сучасні методи секвенування дозволяють виявляти лише 10 геномних еквівалентів ДНК *B. anthracis* на нанограм фонові нуклеїнової кислоти. Автори розробки вказують, що виявлення здійснювалося шляхом картографічного зчитування за допомогою визначеної підмножини еталонних геномів чи повної бази даних GenBank [32]. Крім того, за даними нуклеотидних послідовностей геному можна було диференціювати *B. anthracis*, *B. cereus* та *B. thuringiensis*. Також було запропоновано технологію мікрочіпів мікробного перепису, яка продемонструвала ефективність виявлення *B. anthracis* у тих же зразках, що і метод секвенування, а також можливість виявлення у пробах повітря та ґрунту інших мікроорганізмів.

Отже, методи виявлення *B. anthracis* продовжують удосконалюватися у напрямку підвищення чутливості, специфічності та швидкості отримання результатів індикації збудника та його спор у навколишньому середовищі. Насамперед це пов'язано з необхідністю ефективного функціонування системи біобезпеки та біозахисту населення.

Висновки.

1. На теперішній час проблема діагностики сибірки і виявлення *B. anthracis* в об'єктах довкілля залишається актуальною, що пов'язано як із зростанням ризиків біотероризму, так і з широкомасштабними військовими діями РФ проти України, у результаті яких можливі руйнування скотомогильників та контамінація спорами збудника навколишнього середовища.

2. Фенотипова та генотипова схожість *B. anthracis* з іншими видами *Bacillus* утруднює її ідентифікацію та вимагає розробки високоспецифічних та високочутливих методів виявлення збудника, зокрема і в об'єктах довкілля.

3. Виявлення *B. anthracis* (збудника особливо-небезпечної хвороби) або її спор потребує швидкого отримання результатів первинного дослідження. З цією метою можуть бути використані швидкі методи індикації. Подальшу ідентифікацію збудника здійснюють або класичним бактеріологічним методом, який вважається золотим стандартом діагностики захворювання, або виявленням нуклеїнових кислот збудника у пробах, отриманих з об'єктів довкілля.

Література

1. CDC. Bioterrorism Agents/Diseases. April 4, 2018. Available from: <https://emergency.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp>
2. Kozytska T., Neubauer H., Bassiouny M., Chechet O., Ordynskaet D., Galanteal D. et al. Retrospective Analysis of Official Data on Anthrax in Europe with a Special Reference to Ukraine. *Microorganisms* 2023; 11(5), 1294. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051294>
3. Центр громадського здоров'я МОЗ України, 02.10.2018 Available from: <https://www.phc.org.ua/news/v-ukraini-zafiksovano-vipadok-sibirki-vognische-lokalizovano-nebezpeki-rozpozovsyudzhennya>
4. Рубленко І. О., Рубленко С. В. Визначення ефективності методик виділення спор збудника *Bacillus anthracis* із ґрунту. *Науковий вісник ветеринарної медицини*. 2019; 2: 29–35
5. Zasada A. A. Detection and Identification of *Bacillus anthracis*: From Conventional to Molecular Microbiology Methods. *Microorganisms*. 2020;8(1):125. DOI: <https://doi.org/10.3390%2Fmicroorganisms8010125>
6. Xu J., Bai X., Zhang X., Yuan B., Lei L., Guo Y. et al. Development and application of DETECTR-based rapid detection for pathogenic *Bacillus anthracis*. *Analytica Chimica Acta*. 2023;1247:340891. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2023.340891>.
7. Wang D. B., Yang R., Zhang Z. P., Bi L. J., You X. Y., Wei H. P. et al. Detection of *B. anthracis* spores and vegetative cells with the same monoclonal antibodies. *PLoS ONE*. 2009;4:e7810. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007810>
8. Kuehn A., Kováč P., Saksena R., Bannert N., Klee S. R., Ranisch H., Grunow R. Development of antibodies against anthrose tetrasaccharide for specific detection of *Bacillus anthracis* spores. *Clin. Vaccine Immunol*. 2009;16:1728–37. doi: <https://doi.org/10.1128/cvi.00235-09>
9. Tamborrini M., Holzer M., Seeberger P. H., Schürch N., Pluschke G. Anthrax spore detection by a luminex assay based on monoclonal antibodies that recognize anthrose-containing oligosaccharides. *Clin. Vaccine Immunol*. 2010;17:1446–51. DOI: <https://doi.org/10.1128%2FCVI.00205-10>

10. Turnbough C. L. Discovery of phage display peptide ligands for species-specific detection of *Bacillus* spores. *J. Microbiol. Methods.* 2003;53(2):263–71. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(03\)00030-7](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(03)00030-7)
11. Pillai S. P., Prentice K. W., Ramage J. G., DePalma L., Sarwar J., Parameswaran N. et al. Rapid presumptive identification of *Bacillus anthracis* isolates using the Tetracore RedLine Alert™ test. *Health Secur.* 2019;17(4):334–43. DOI: <https://doi.org/10.1089/hs.2019.0038>
12. Sastry K. S., Tuteja U., Santhosh P. K., Lalitha M. K., Batra H. V. Identification of *Bacillus anthracis* by a simple protective antigen-specific mAb dot-ELISA. *J. Med. Microbiol.* 2003;52 (Pt 1):47–49. DOI: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05027-0>
13. Mechaly A., Vitner E., Levy H., Weiss S., Bar-David E., Gur D. et al. Simultaneous immunodetection of anthrax, plague, and tularemia from blood cultures by use of multiplexed suspension arrays. *J. Clin. Microbiol.* 2018; 56(4):e01479–17. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.01479-17>
14. Liu Z., Wang T., He L., Nan X., Sun X., Bai P. A double emission turn-on Eu-MOF-based luminescent sensor towards an anthrax biomarker. *Microchemical Journal.* 2022; 180: 107618. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107618>
15. Gooding J. Biosensor technology for detecting biological warfare agents: Recent progress and future trends. *Anal. Chim. Acta.* 2006;559(2):137–51. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.12.020>
16. Ireng L. M., Gala J. L. Rapid detection methods for *Bacillus anthracis* in environmental samples: a review. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012; 93: 1411–22. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3845-7>
17. Merrill L., Dunbar J., Richardson J., Kuske C. R. Composition of *Bacillus* species in aerosols from 11 U.S. cities. *J. Forensic Sci.* 2006; 51(3):559–65. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2006.00132.x>
18. Makino S., Cheun H. I. Application of the real-time PCR for the detection of airborne microbial pathogens in reference to the anthrax spores. *J. Microbiol. Methods.* 2003 May;53(2):141–7. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(03\)00019-8](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(03)00019-8)
19. Makino S. I., Cheun H. I., Watarai M., Uchida I., Takeshi K. Detection of anthrax spores from the air by real-time PCR. *Lett Appl Microbiol.* 2001;33(3):237–40. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2001.00989.x>
20. Campbell G. A., deLesdernier D., Mutharasan R. Detection of airborne *Bacillus anthracis* spores by an integrated system of an air sampler and a cantilever immunosensor, Sensors and Actuators B: Chemical, 2007; 127(2):376–82. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2007.04.038>
21. Davila A. P., Jang J., Gupta A. K., Walter T., Aronson A., Bashir R. Microresonator mass sensors for detection of *Bacillus anthracis* Sterne spores in air and water. *Biosens Bioelectron.* 2007; 22(12):3028–35. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2007.01.012>
22. Spaulding U. K., Christensen C. J., Crisp R. J., Vaughn M. B., Trauscht R. C., Gardner JR., et al. RAZOR EX anthrax air detection system. *J AOAC Int.* 2012;95(3):860–91. DOI: <https://doi.org/10.5740/jaoacint.11-521>
23. Hadfield T., Ryan V., Spaulding U. K., Clemens K. M., Ota I. M., Brunelle S. L. RAZOR EX Anthrax Air Detection System for detection of *Bacillus anthracis* spores from aerosol collection samples: collaborative study. *J AOAC Int.* 2013;96(2):392–8. DOI: <https://doi.org/10.5740/jaoacint.cs2012-06>
24. Nelson S., Hofacre K., Calfe W., Serreet Sh., Benard E., Graham C. et al. Evaluation of two methods for detection of viable *Bacillus anthracis* simulant spores in maritime environmental samples. *Environ Monit Assess.* 2023;195(2):257. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10661-022-10772-8>
25. Методичні рекомендації. Лабораторна діагностика сибірки тварин, індикація збудника з патологічного та біологічного матеріалу, сировини тваринного походження та об'єктів навколишнього середовища. Київ, 2014. Розробники: Державна ветеринарна та фітосанітарна служба України, Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, Державний науково-дослідний інститут лабораторної діагностики і ветеринарно-санітарної експертизи.
26. Silvestri E. E., Perkins S. D., Feldhake D., Nichols T., Schaefer F. W. Recent literature review of soil processing methods for recovery of *Bacillus anthracis* spores. *Ann Microbiol* (2015); 65:1215–26. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13213-014-0932-x>
27. Gullede J. S., Luna V. A., Luna A. J., Zartman R., Cannons A. C. Detection of low numbers of *Bacillus anthracis* spores in three soils using five commercial DNA extraction methods with and without an enrichment step. *J Appl Microbiol.* 2010; 109(5):1509–20. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04774.x>
28. Rohde A., Papp S., Feige P., Grunow R., Kaspari O. Development of a novel selective agar for the isolation and detection of *Bacillus anthracis* *J Appl Microbiol.* 2020;129(2):311–18. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.14615>
29. Sharp N. J., Molineux I. J., Page M. A., Schofield D. A. Rapid Detection of Viable *Bacillus anthracis* Spores in Environmental Samples by Using Engineered Reporter Phages. *Appl Environ Microbiol.* 2016; 82(8): 2380–87. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.03772-15>
30. Ireng L. M., Gala J. L. Rapid detection methods for *Bacillus anthracis* in environmental samples: a review. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012; 93:1411–22. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-011-3845-7>
31. Be N. A., Thissen J. B., Gardner S. N., McLoughlin K. S., Fofanov V. Y., Koshinsky H. et al. Detection of *Bacillus anthracis* DNA in complex soil and air samples using next-generation sequencing. *PLoS One* 2013;8(9):e73455 DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073455>
32. Makino S. I., Watarai M., Janchivdorj E. Rapid and effective detection of anthrax spores in soil by PCR. *J Appl Microbiol.* 2003; 95(4):728–33. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02038.x>

Відомості про авторів:

Задорожна В. І. – д. м. н., проф., член-кореспондент НАМН України, директор ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського НАМН України», Київ.
ORCID: 0000-0002-0917-2007

Шагінян В. Р. – д. м. н., старший науковий співробітник, завідувач відділу діагностики інфекційних та паразитарних хвороб ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського НАМН України», Київ.
ORCID: 0000-0002-2746-3414

Information about the authors:

Zadorozhna V. I. – Doctor of Medicine, Professor, Corresponding member of National Academy of Medical Sciences of Ukraine, director of the SI «The L. V. Hromashevskiy Institute of Epidemiology and Infectious Diseases of National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kyiv.
ORCID: 0000-0002-0917-2007

Shahinian V. R. – Doctor of Medicine, Senior Researcher, Head of the Department of Diagnostics of Infectious and Parasitic Diseases of the SI «The L. V. Hromashevskiy Institute of Epidemiology and Infectious Diseases of National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kyiv. .
ORCID: 0000-0002-2746-3414