

According to the results of poultry's researches (1228 heads) it was established that 82.3 % of vaccinated hens and 48.2 % of turkeys had a formed herd immunity to NC and the possibility of this virus persistence in waterfowl: unvaccinated ducks (100 %) and geese (100 %).

When researches concerning blood serum antibodies to the virus of bird's influenza were not detected in IFA on the poultry farm but antibodies to CEM-1 and CEM-4 were found. The presence of antibodies may indicate possible CEM circulation among birds.

Conclusions. 1. It had been established the absence of HPAI virus circulation in poultry populations in the Black Sea region.

2. There was a formed herd immunity to NC among 82.3% of vaccinated hens and among 48.2 % of turkeys. We received negative results against NC pathogen studying blood serum of wild and synanthropic birds.

3. According to the results of IFA in ducks blood serum, antibodies to the virus of bird's influenza were not detected, however it was found antibodies to CEM-1 (number of positive samples was 100 % and the average antibody's titer was  $7.75 \pm 0.96 \log_2$ ) and to CEM-4 (number of positive samples was 70 % and the average antibody's titer was  $4.6 \pm 0.63 \log_2$ ).

**Keywords:** epizootic monitoring, highly pathogenic influenza, Newcastle disease, paramyxoviruses, titer of antibodies

UDC: 619.618:852.11

## MICROEVOLUTION FROM A YOUNG ANCESTOR (M.A.Y.A.) SUGGESTS A SOIL-BORNE LIFE CYCLE OF *BACILLUS ANTHRACIS*

**Peter Braun**<sup>1,3</sup>, **Gregor Grass**<sup>1</sup>, **Angela Aceti**<sup>2</sup>, **Luigina Serrecchia**<sup>2</sup>, **Leonardo Marino**<sup>2</sup>,  
**Matthias Hanczaruk**<sup>1</sup>, **Enrico Georgi**<sup>1</sup>, **Markus Antwerpen**<sup>1</sup>, **Bernd Northoff**<sup>1,5</sup>,  
**Michael Schloter**<sup>3,4</sup>, **Antonio Fasanella**<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Bundeswehr Institute of Microbiology, Munich, Germany

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale of Puglia and Basilicata; Anthrax Reference Institute of Italy; Foggia, Italy

<sup>3</sup> Technische Universität München, Munich, Germany

<sup>4</sup> German Research Center for Environmental Health, Research Unit for Environmental Genomics Neuherberg, Germany

<sup>5</sup> Ludwig Maximilians Universität München, Institut für Laboratoriumsmedizin, Munich, Germany

**Introduction:** *Bacillus anthracis*, the causative agent of anthrax-disease, uses its host for massive cell proliferation. After demise of the animal the pathogen is disseminated from the carcass as endospores that can survive in the environment for several decades. However we still know very little about the ability of the bacteria to replicate in the environment without the host-animal. In experimental settings *B. anthracis* is able to multiply in soil-dwelling amoebae and even survive as a saprophyte. Strains lacking one or both virulence plasmids can frequently be isolated from soil. This loss might be an indication of a soil-borne cycle of the pathogen.

**Objectives:** To test the hypothesis of a soil-borne lifecycle we investigated two burial sites where two bovines were buried during an anthrax epidemic in Pollino Natural Park (Italy) in 2004. If there is *B. anthracis*-proliferation then genotypes of strains isolated from near the surface (5-cm) of contaminated soil should be on a different evolutionary trajectory from those residing at 100-cm depth near the carcass. It was the expectation that the surface population would yield a higher genetic diversity. The aim of this project was testing such microevolution using genomic tools.

**Methods:** The genetic diversity of randomly picked *B. anthracis*-isolates was compared by 31-Loci MLVA, 4-loci SNR analysis and whole genome sequencing.

**Results:** MLVA-31 analysis of 114 isolates only revealed three differences, none of which in near-surface isolates. SNR 4-loci-screening of 174 isolates revealed 18 differences (in loci HM1 or HM2, respectively) ten of which in 5-cm isolates. This represented approximately a very similar percentage of occurrences of SNR-variants for near-surface (9.9 %) and near-carcass (10.9 %). Except of one repeat count reduction by 4 bp in a surface-isolate, which was a novel allele, the other SNR-alleles had been observed before in genotyping analysis of the 2004 outbreak isolates. Genome sequencing of nine 5-cm- and 100-cm-isolates, respectively, revealed five isolate-specific SNPs, four of which only found in different isolates from 5-cm. Notably, one of these randomly-picked surface-isolates lacked plasmid pXO1.

**Conclusion:** Overall, our results indicate that MLVA- and SNR-based genotyping do not provide high enough resolution power for microevolution analysis at aging anthrax foci. Conversely, loss of a virulence plasmid and a higher number of isolate-specific SNPs in near-surface compared to near-carcass isolates suggest limited proliferation of *B. anthracis* and hint at an animal independent life-cycle of the pathogen. In our hypothesis, genetic changes occur as spores passively migrate towards the soil surface and alternately germinate and sporulate.

**Keywords:** *Bacillus anthracis*, anthrax, outbreak investigation, microevolution, genome sequencing, natural foci

МІКРОЕВОЛЮЦІЯ "МОЛОДИХ" ПОПЕРЕДНИКІВ (М.А.У.А.) ВПЛИВАЄ  
НА ЖИТТЄВИЙ ЦИКЛ БАЦИЛ СИБІРКИ В ҐРУНТІ

Пітер Браун <sup>1,3</sup>, Грегор Грасс <sup>1</sup>, Анжела Ацеті <sup>2</sup>, Луджіна Серреція <sup>2</sup>,  
Леонардо Марино <sup>2</sup>, Матіас Ханцарук <sup>1</sup>, Енріко Георгі <sup>1</sup>, Маркус Антверпен <sup>1</sup>,  
Бернд Нортгофф <sup>1,5</sup>, Майкл Шольтер <sup>3,4</sup>, Антоніо Фазанелла <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Інститут мікробіології Бундесверу, Мюнхен, Німеччина

<sup>2</sup> Експериментальний інститут зоопрофілактики Апулія і Базіліката; Фоджа, Італія

<sup>3</sup> Universität München Technische, Мюнхен, Німеччина

<sup>4</sup> Німецький центр досліджень з гігієни довкілля, Нойхерберг, Німеччина

<sup>5</sup> Мюнхенський університет Людвіга Максиміліана, Мюнхен, Німеччина

**Введення:** Збудник сибірки використовує організми-хазяї для проліферації своїх клітин. Після загибелі тварини збудник поширюється від туші у вигляді ендоспор, які можуть виживати в навколишньому середовищі протягом кількох десятиліть. Однак ми досі дуже мало знаємо про здатність бактерій розмножуватися в середовищі без тварини-господаря. В експериментальних умовах *B. anthracis* здатний розмножуватися в клітинах амеб в ґрунті і навіть існувати, як сапрофітна мікрофлора. Штами, в геномі яких не вистачає однієї або обох плазмід вірулентності можуть часто бути виділені з ґрунту. Втрата цих маркерів патогенності може бути причиною ґрунтового циклу розвитку збудника.

**Цілі досліджень:** З метою перевірки гіпотези про життєвий цикл збудника в ґрунті нами досліджено два місця поховання тварин, де були поховані два голови великої рогатої худоби під час епізоотії сибірки в природному парку Полліно (Італія) в 2004 р. Наукова гіпотеза полягала у наявності різниці між біологічними, зокрема, генетичними особливостями ізолятів збудника сибірки з ґрунту на глибині 5 та 100 см. Метою нашого проекту було тестування такої мікроеволюції з використанням інструментів дослідження геному збудника.

**Методи:** генетичну варіабельність довільно обраних ізолятів збудника сибірки порівнювали за 31-локусним MLVA, 4-локусним аналізом SNR і всього геному.

**Результати досліджень:** MLVA-31 аналіз 114 ізолятів виявив лише три відмінності, жодна з яких була знайдена в геномі приповерхневих ізолятів. Скринінгом SNR 4-локусів 174 ізолятів виявлено 18 відмінностей (в локусах HM1 або HM2, відповідно), десять з яких - в ізолятах з поверхні ґрунту. Це демонструвало схожий відсоток SNR-варіантів для приповерхневих (9,9 %) і глибинних, 100 см, ізолятів (10,9 %). За винятком одного повтору зменшення числа на 4 п.н. у поверхневого ізоляту, який мав новий алель, інші SNR-алелі було детектовано раніше при аналізі аналізі даних генотипування збудника за спалаху сибірки 2004 р. Секвенування геному з дев'яти ізолятів збудника сибірки з ґрунтових горизонтів 5 і 100 см, відповідно, показало, що п'ять ізолятів мають конкретні SNPs, чотири з яких можна знайти тільки у ізолятах, виділених на 5 см глибині ґрунту. Слід відмітити, що один з цих випадково підібраних поверхневих ізолятів був позбавлений плазмиди рХО1.

**Висновок:** У цілому, наші результати показують, що MLVA- і SNR- генотипування не мають достатньої точності та інформативності для аналізу мікроеволюційних характеристик щодо "старіння" популяції збудника сибірки. І навпаки, втрата плазмиди вірулентності і великим числом форм специфічного поліморфізму приповерхневих ізолятів в порівнянні з глибинними формами збудника натякають на залежність генетичних профілів від характеру життєвого циклу збудника. Згідно нашої гіпотези, генетичні зміни відбуваються під час пасивної міграції збудника сибірки до поверхні ґрунту і чергування вегетації і утворення бацилою спор.

**Ключові слова:** *Bacillus anthracis*, сибірка, розслідування спалахів, мікроеволюція, секвенування геному, природні вогнища