

Лобач Роман Николаевич

**ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ СИБИРЕЯЗВЕННЫХ
ИММУНОГЛОБУЛИНОВ И БАКТЕРИОФАГА ГАММА А-26 ПРИ
ВЫЯВЛЕНИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ**

03.02.03 – микробиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2014

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:
Саяпина Лидия Васильевна

доктор медицинских наук, главный эксперт Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Официальные оппоненты:
Коровкин Сергей Анатольевич

доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» Российской академии медицинских наук

Кравцов Эдуард Георгиевич

кандидат медицинских наук, доцент кафедры микробиологии и вирусологии медицинского факультета Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов»

Ведущая организация:

Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита состоится «__» _____ 2014 года в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 212.203.05 при Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов» по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.8.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке УНИБЦ (Научная библиотека) ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.6) и на сайте www.rudn.ru
Автореферат размещен на сайте www.vak.ed.gov.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2014 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук, доцент

Гигани Ольга Борисовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Сибирская язва относится к особо опасным инфекциям с острым началом, тяжелым течением и высокой летальностью, которая при несвоевременном лечении, может достигать 90 % (Макаров В.В. и др., 2012; Маринин Л.И. и др., 2008, Swartz M., 2001). Одной из главных причин эпидемического неблагополучия по сибирской язве является способность возбудителя образовывать во внешней среде устойчивые споры, годами сохраняющие свою жизнеспособность и патогенные свойства, что представляет собой опасность для людей и животных (Онищенко Г.Г. и др., 1999, 2009; Черкасский Б.Л., 2004; Ладный В.И. и др., 2009; Кологоров А.И. и др., 2010). Кроме этого, существует возможность завоза инфицированных животных, сырья и продуктов животного происхождения, контаминированных спорами возбудителя, из неблагополучных по сибирской язве стран (Еременко Е.И. и др., 2010).

За последние 5 лет заболеваемость сибирской язвой на территории Российской Федерации несколько стабилизировалась, однако все еще остается на высоком уровне. Эпидемическая ситуация по данному заболеванию на ближайшие годы прогнозируется как неблагополучная (Куличенко А.Н. и др., 2011; Онищенко Г.Г., 2010; Рязанова А.Г. и др., 2011). Учитывая вышеизложенное, своевременное выявление и идентификация возбудителя сибирской язвы, является актуальным.

В системе противоэпидемических мероприятий важное место отводится мониторингу за циркуляцией *Bacillus anthracis*. Диагностика сибирской язвы включают в себя обнаружение возбудителя в исследуемом материале, выделение и идентификацию культуры. Основными методами индикации сибирской язвы являются метод флуоресцирующих антител (МФА) с помощью флуоресцирующих иммуноглобулинов и ПЦР, а также экспресс-методы (ИФА, РНГА).

Из современных наиболее доступных и надежных сигнальных методов серологической диагностики является МФА в реакции иммунофлуоресценции (РИФ) (Куличенко А.Н. и др., 2010; Саяпина Л.В. и др., 2010). Положительные результаты, полученные в ходе проведения МФА, позволяют сделать предварительный вывод о наличии возбудителя сибирской язвы в исследуемом материале и своевременно начать проведение противоэпидемических и профилактических мероприятий.

Несмотря на совершенствование лабораторной диагностики сибирской

язвы, использование традиционных методов идентификации возбудителя, не утратили своего значения. Важная роль при идентификации типичных и атипичных штаммов *Bacillus anthracis*, отводится определению их чувствительности к бактериофагам (Рязанова А.Г. и др. 2009; Головинская Т.М. и др., 2011). Одним из направлений улучшения лабораторной диагностики сибирской язвы является использование зарегистрированных препаратов (Порядок организации и проведения лабораторной диагностики сибирской язвы для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней» МУК 4.2.2941-11).

Специалистами Ставропольского научно-исследовательского противочумного института (Ставропольский НИПЧИ) предложены иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие вегетативные и споровые адсорбированные и бактериофаг Гамма А-26, предназначенные для обнаружения и идентификации возбудителя сибирской язвы в объектах окружающей среды и биологическом материале.

В связи с этим, исследования по изучению диагностической ценности сибирезвенных препаратов, предназначенных для выявления и идентификации возбудителя сибирской язвы, являются актуальными.

Цель исследования – изучить диагностическую ценность сибирезвенных иммуноглобулинов флуоресцирующих (вегетативные и споровые) адсорбированных и бактериофага Гамма А-26 на этапах индикации и идентификации возбудителя сибирской язвы.

Задачи исследования:

1. Оценить специфическую активность и специфичность иммуноглобулинов флуоресцирующих сибирезвенных вегетативных адсорбированных в РИФ по сравнению с бактериологическим методом (тест на гемолиз).

2. Охарактеризовать диагностическую ценность (специфическая активность и специфичность) иммуноглобулинов флуоресцирующих сибирезвенных споровых адсорбированных на чистых культурах, в пробах из объектов окружающей среды и биологического материала.

3. В сравнительных испытаниях определить широту диапазона литической активности и специфичности бактериофагов диагностических сибирезвенных Гамма А-26 и Fah ВНИИВВиМ.

4. Обосновать возможность использования сибирезвенных препаратов иммуноглобулинов флуоресцирующих (вегетативные и споровые) адсорбированных и бактериофага Гамма А-26 для индикации и идентификации возбудителя сибирской язвы в лабораторной диагностике.

Научная новизна

Впервые установлена высокая специфическая активность иммуноглобулинов сибирезвенных вегетативных адсорбированных при исследовании мазков из чистых культур, проб из объектов окружающей среды и биологического материала (мясо животного), контаминированных *B. anthracis*. Показано, что иммуноглобулины в разведении 1:64 обеспечивают специфическое свечение $93,8 \pm 6,0$ % из 16 исследуемых штаммов *B. anthracis* в вегетативной форме.

Впервые на представительном материале (объекты окружающей среды, биологический материал, чистые культуры) установлена диагностическая ценность иммуноглобулинов флуоресцирующих сибирезвенных споровых адсорбированных, обеспечивающих в разведении 1:64 специфическое свечение сибирезвенного микроба в споровой форме в мазках чистых культур, проб из объектов окружающей среды (смывы, корма, вода, почва) и биологического материала и не вызывающих специфического свечения со штаммами близкородственных микроорганизмов.

Доказано преимущество проведения РИФ с помощью иммуноглобулинов флуоресцирующих сибирезвенных вегетативных и споровых адсорбированных перед бактериологическим методом (тест на гемолиз) при исследовании проб объектов окружающей среды и биологического материала по времени учета результатов – 2,5-3 ч против 40 ч соответственно.

Новыми являются данные сравнительных исследований бактериофагов сибирезвенных Гамма А-26 и Fah ВНИИВВиМ (ветеринарного). Испытываемый бактериофаг Гамма А-26 обладает широким диапазоном действия к исследуемым штаммам *B. anthracis* и высокой специфичностью в отношении близкородственных микроорганизмов. Установлено, что сибирезвенный бактериофаг Гамма А-26 лизировал $97,9 \pm 2,1$ % типичных и атипичных штаммов *B. anthracis* из 47 исследуемых и не лизировал $95,8 \pm 2,36$ % из 72 штаммов близкородственных микроорганизмов.

Обоснована целесообразность применения в практическом здравоохранении изучаемых иммуноглобулинов сибирезвенных вегетативных и споровых адсорбированных, а также бактериофага сибирезвенного

Гамма А-26, предназначенных для индикации и идентификации возбудителя сибирской язвы.

Практическая значимость работы

В результате работы внедрены в практику следующие препараты:

Иммуноглобулины флуоресцирующие сибирезвенные вегетативные адсорбированные сухие (Регистрационное удостоверение № ФСР 2011/11338);

Иммуноглобулины флуоресцирующие сибирезвенные споровые адсорбированные сухие (Регистрационное удостоверение № ФСР 2011/11339);

Бактериофаг сибирезвенный Гамма А-26 жидкий (Регистрационное удостоверение № ФСР 2011/10415).

Внесены изменения в нормативную документацию:

Технические условия (ТУ) 9389-003-01897080-2010 и инструкцию по применению на иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие сибирезвенные вегетативные адсорбированные сухие (Акт внедрения рекомендаций, утвержденный директором ФКУЗ Ставропольского НИПЧИ);

Технические условия 9389-005-01897080-2010 и инструкцию по применению на иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие сибирезвенные споровые адсорбированные сухие (Акт внедрения рекомендаций, утвержденный директором ФКУЗ Ставропольского НИПЧИ);

Технические условия 9389-013-01897080-2009 и инструкцию по применению на бактериофаг диагностический сибирезвенный Гамма А-26 жидкий (Акт внедрения рекомендаций, утвержденный директором ФКУЗ Ставропольского НИПЧИ).

Материалы диссертации используются при чтении лекций на курсах повышения квалификации специалистов по особо опасным инфекциям.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Испытываемые иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие сибирезвенные вегетативные адсорбированные в разведении 1:64 обеспечивают специфическое свечение $93,8 \pm 6,0$ % штаммов *B. anthracis* в вегетативной форме, что позволяет их использовать для индикации при исследовании чистых культур, объектов окружающей среды и биологического материала в лабораторной диагностике сибирской язвы.

2. Диагностический препарат иммуноглобулины флуоресцирующие сибирезвенные споровые адсорбированные в разведении 1:64 выявляет

93,8±6,0 % исследуемых штаммов *B. anthracis* и в 96,9±3,1 % случаев не реагирует со штаммами близкородственных микроорганизмов; в пробах из объектов внешней среды и биологического материала сибиреязвенный микроб обнаруживается в 100 % случаев.

3. Использование иммуноглобулинов сибиреязвенных вегетативных и споровых адсорбированных в РИФ имеет явное преимущество перед бактериологическим методом (тест на гемолиз) при исследовании проб объектов окружающей среды и биологического материала по времени постановки и учету результатов – 2,5-3 ч против 40 ч.

4. Бактериофаг диагностический сибиреязвенный Гамма А-26 обладает широким диапазоном литической активности и специфичностью, что подтверждено наличием лизиса 97,9±2,1 % штаммов *B. anthracis* из 47 исследуемых и ее отсутствием в 95,8±2,36 % случаев при исследовании 72 штаммов близкородственных микроорганизмов. При учете результатов установлено, что бактериофаг сибиреязвенный Гамма А-26 превосходит препарат сравнения по четкости лизиса исследуемых штаммов *B. anthracis*.

Работа выполнена на базах лаборатории препаратов против чумы и др. особо опасных инфекций ГИСК им Л.А. Тарасевича, Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб», Иркутского НИПЧИ, Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии (п. Оболенск), бактериологической лаборатории ФГКУ 294 ЦСООР МЧС РФ.

Апробация материалов диссертации

Материалы диссертации нашли отражение на Всероссийских и межгосударственных научно-практических конференциях: научно-практической конференции «Итоги и перспективы фундаментальных и прикладных исследований в РосНИПЧИ «Микроб» (Саратов, 2009); XI Межгосударственной научно-практической конференции «Современные технологии в совершенствовании мер предупреждения и ответных действий на чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения санитарно-эпидемиологического характера» (Саратов, 2012); на 2 научно-практической конференции молодых ученых «Научные подходы к повышению качества экспертизы лекарственных средств: реалии и перспективы» в ФГБУ «НЦЭСМП Минздрава России» (Москва, 2013 г.).

Материалы диссертации вошли в отчеты по законченным техническим и медицинским испытаниям сибиреязвенных препаратов за период 2007 - 2010 гг.

Результаты исследований были использованы при составлении 3 нормативных документов: Технические условия 9389-003-01897080-2010 и инструкция по применению на Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие сибиреязвенные вегетативные адсорбированные сухие;

Технические условия 9389-005-01897080-2010 и инструкция по применению на Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие сибиреязвенные споровые адсорбированные сухие;

Технические условия 9389-013-01897080-2009 и инструкция по применению на Бактериофаг диагностический сибиреязвенный Гамма А-26 жидкий.

Публикации

По теме диссертации опубликованы 4 статьи, 3 из них в изданиях, рекомендованных ВАК Российской Федерации.

Личный вклад автора

Обоснование проблемы, постановка цели и задачи работы, выбор методов исследования, выполнение экспериментальной и аналитической части работы, обобщение и интерпретация полученных данных, подготовка научных публикаций. Соискателем проведен анализ полученных данных, сформулированы основные положения диссертации, составляющие ее новизну и практическую значимость.

Структура и объем диссертации

Работа изложена на 135 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, 3 глав результатов собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы. Диссертация иллюстрирована 14 таблицами и 7 рисунками. Библиографический указатель включает 168 источников литературы, в том числе 117 отечественных и 51 зарубежных авторов.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы исследования. В работе были использованы экспериментально-производственные серии иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих сибиреязвенных вегетативных адсорбированных, иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих сибиреязвенных споровых адсорбированных, сибиреязвенного

диагностического бактериофага Гамма А-26, коммерческая серия сибиреязвенного бактериофага Fah ВНИИВВиМ (ветеринарный).

Для определения чувствительности, специфической активности и специфичности иммуноглобулинов сибиреязвенных вегетативных и споровых были исследованы 16 штаммов чистых культур микроорганизмов *B. anthracis*, 32 штамма близкородственных микроорганизмов *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. thuringiensis*, *B. anthracoides*; 450 проб из объектов окружающей среды (смывы, вода, почва, корма), биологического материала (мясо животного), контаминированных *B. anthracis* в концентрациях 10^6 , 10^7 , 10^8 м.к./мл и 10^6 , 10^7 , 10^8 спор/мл и близкородственными микроорганизмами (*B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracoides*) – в концентрациях 10^7 и 10^8 м.к./мл или спор/мл. Исследуемые штаммы и пробы были зашифрованы, дешифровка проводилась после учета результатов.

При изучении широты спектра литической активности сибиреязвенного бактериофага Гамма А-26 были исследованы 47 штаммов *B. anthracis* и 72 штамма близкородственных микроорганизмов. Каждый опыт проводили с соблюдением принципов строго контролируемого эксперимента.

Изучение диагностической ценности (чувствительность, специфическая активность, специфичность, воспроизводимость) иммуноглобулинов флуоресцирующих сибиреязвенных вегетативных и споровых проводили в соответствии с разработанными Программами исследований, включающие выбор метода сравнения, подбор штаммов *B. anthracis* и близкородственных микроорганизмов; а также подготовку проб (объекты окружающей среды, биологический материал) для исследования в РИФ.

Микроскопию мазков проводили с помощью люминесцентного микроскопа «Carl Zeiss Primo Star» под иммерсионным объективом. Постановку теста на гемолиз со штаммами *B. anthracis* и близкородственных микроорганизмов осуществляли в соответствии с МУ «Лабораторная диагностика для обнаружения сибирской язвы», 2008.

Диапазон литического спектра сибиреязвенного бактериофага Гамма А-26 изучали в соответствии с разработанной Программой исследования диагностической ценности бактериофага, включающей выбор препарата сравнения, подбор штаммов *B. anthracis* (типичные, атипичные) и близкородственных микроорганизмов для определения диапазона литической активности и специфичности действия бактериофага и инструкцией по применению бактериофага сибиреязвенного Fah ВНИИВВиМ.

Статистические методы оценки результатов исследования

В работе использованы стандартные методы вариационной статистики экспериментальных данных (Ашмарин И.П., Воробьев А.А., 1962; Лакин Г.Ф., 1990).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение специфической активности и специфичности иммуноглобулинов флуоресцирующих сибиреязвенных вегетативных адсорбированных

Своевременность проведения противоэпидемических и профилактических мероприятий в очагах сибирской язвы зависит от эффективности лабораторной диагностики. Метод флуоресцирующих антител относится к основным сигнальным методам, так как является достаточно информативным, обеспечивающим быстрое и достоверное обнаружение возбудителя сибирской язвы на ранних этапах диагностики.

Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие сибиреязвенные вегетативные адсорбированные представляют собой иммуноглобулиновую фракцию к водорастворимому антигену вегетативной формы *B. anthracis*, выделенную из гипериммунной кроличьей сыворотки, адсорбированную на основе магноиммуносорбентов водорастворимыми антигенами штаммов *B. cereus*. Препарат предназначен для обнаружения вегетативной формы *B. anthracis* в РИФ в мазках из чистых культур, объектов окружающей среды (почва, подстилка, вода, продовольственное сырье, фураж) и биологического материала (продукты животного происхождения).

В ходе работы установлено, что иммуноглобулины по физико-химическим свойствам соответствовали требованиям нормативной документации (НД). Содержимое ампулы представляло собой аморфную пористую массу желто-оранжевого цвета, которая при растворении очищенной водой имела вид прозрачной жидкости желто-оранжевого цвета, значение рН 7,6 (норма 7,5-8,5).

Специфическую активность иммуноглобулинов определяли при просмотре мазков, приготовленных из 16 штаммов *B. anthracis* в концентрации $1,0 \times 10^8$ м.к./мл и окрашенных препаратом в разведениях от 1:8 до 1:256. Показано, что препарат в разведении 1:128 выявлял только 10 исследуемых штаммов сибиреязвенного микроба, что составило $62,5 \pm 12,1$ %. Учитывая полученные результаты, за рабочее разведение иммуноглобулинов было принято разведение 1:64, что подтверждено специфическим свечением с

интенсивностью на 3-4 креста у $93,8 \pm 6,0$ % из исследованных штаммов *B. anthracis* (рис. 1).

Одновременно было показано, что иммуноглобулины вегетативные адсорбированные в разведении 1:64 окрашивали 8 штаммов $25,0 \pm 7,65$ % других видов *Bacillus*, из 32 взятых в исследование. Сравнительно невысокую специфичность препарата $75,0 \pm 5,6$ % можно объяснить генетическим родством сибиреязвенного микроорганизма с другими видами рода *Bacillus*.

Определение чувствительности реакции иммунофлуоресценции по выявлению иммуноглобулинами в рабочем разведении минимального количества микробных клеток в мазках из штаммов *B. anthracis* в концентрациях от 1×10^4 до 1×10^8 м.к./мл, позволило установить их высокую способность обнаруживать возбудителя сибирской язвы в исследованном материале. При просмотре 30 полей зрения в мазках наблюдали специфическое свечение с интенсивностью на 3-4 креста 1-2 и более микробных клеток *B. anthracis* в концентрации $5,0 \times 10^5$ м.к./мл.

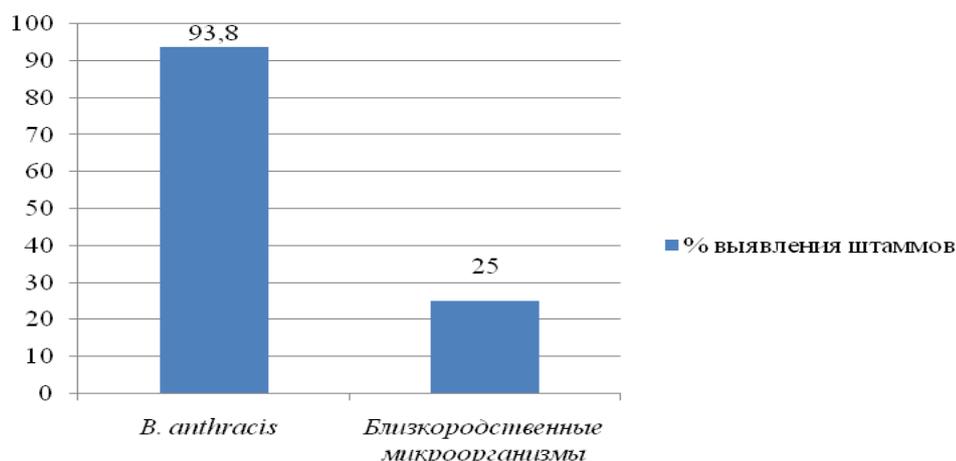


Рисунок 1 – Результаты специфической активности и специфичности иммуноглобулинов вегетативных адсорбированных

Воспроизводимость совпадения положительных и отрицательных результатов в РИФ с помощью иммуноглобулинов вегетативных составила 100 %. Исследования, проведенные в 10 повторностях, при постановке анализа в разные дни и разными исполнителями показали, что во всех определениях со штаммом *B. anthracis* получены совпадающие положительные результаты, в то время как во всех случаях со штаммом *B. cereus* – результаты были отрицательные. Учитывая назначение сибиреязвенных иммуноглобулинов,

особое внимание уделялось подготовке проб из объектов окружающей среды (смывы, вода, почва, корма) и мяса животного (табл. 1).

Таблица 1 – Обобщенные данные исследований иммуноглобулинов флуоресцирующих сибиреязвенных вегетативных адсорбированных

№ п/п	Показатели	Количество проб	Результаты	
			иммуноглобулины флуоресцирующие в разведении 1:64	тест на гемолиз
1.	Чувствительность (минимальное количество микробных клеток <i>B. anthracis</i> , выявляемое в РИФ)	5	$5,0 \times 10^5$ м.к./мл	—*
2.	Специфическая активность (выявляемые штаммы <i>B. anthracis</i>), $M \pm m$ %	16	$93,8 \pm 6,0$	100,0
3.	Специфичность (отрицательные результаты с близкородственными микроорганизмами), $M \pm m$ %	32	$75,0 \pm 5,6$	100,0
4.	Выявляемые штаммы <i>B. anthracis</i> в пробах из объектов внешней среды и биологического материала, $M \pm m$ %	225	100,0	—
5.	Отрицательные результаты с близкородственными микроорганизмами в пробах из объектов внешней среды и биологического материала $M \pm m$ %	225	100,0	—
6.	Скорость учета результатов (с учетом подготовки всех материалов), в часах	чистые культуры	20	20
		объекты внешней среды, биологический материал	2,5-3	40
Примечание: (—) – не предусмотрено методом				

В ходе анализа результатов, полученных при исследовании проб из объектов окружающей среды и биологического материала, установлена высокая диагностическая ценность препарата, который в разведении 1:64 выявлял *B. anthracis* в вегетативной форме в 100 % случаев.

В процессе работы при оценке качества сибиреязвенных вегетативных иммуноглобулинов на соответствие препарата требованиям проекта НД было выявлено, что иммуноглобулины, даже в разведении 1:16 (норма не менее 1:16), не вызывали специфического свечения близкородственных штаммов.

В ходе проведения наших исследований установлено, что рабочее разведение иммуноглобулинов составило 1:64. Причинами расхождения установленного показателя с паспортными данными явилось не однозначность подходов к методике обеззараживания мазков. Разработчики иммуноглобулинов при приготовлении мазков из исследуемого материала осуществляли с применением 96 % спирта без добавления 3 % перекиси водорода.

В процессе нашей работы обеззараживание мазков проводили в соответствии с требованиями Санитарных правил «Безопасность работы с микроорганизмами I и II групп патогенности (опасности)» (СП 1.3.1285-03), предусматривающие применение 96 % спирта и 3 % перекиси водорода. Для исключения негативного воздействия перекиси водорода при окраске мазков препаратом было предложено на этапах их приготовления увеличить время промывки очищенной водой до полного удаления перекиси водорода (в течение 5 мин). Полученные результаты послужили основанием для внесения дополнения в проект НД в методику по обеззараживанию мазков, приготовленных из чистых культур *B. anthracis*, объектов окружающей среды и биологического материала.

В результате проведенных исследований установлена высокая специфическая активность иммуноглобулинов сибиреязвенных, обеспечивающих специфическое свечение штаммов *B. anthracis* в вегетативной форме в мазках, приготовленных из штаммов сибиреязвенного микроба, из биологического материала и объектов внешней среды в 100 % проб. Чувствительность препарата по результатам всех исследований установлена в диапазоне от $5,0 \times 10^5$ до 1×10^6 м.к./мл.

При изучении специфичности в отношении близкородственных микроорганизмов установлено, что иммуноглобулины в $75,0 \pm 5,6$ % случаев не обнаруживали штаммы других видов рода *Bacillus* в реакции иммунофлуоресценции. При этом использование иммуноглобулинов сибиреязвенных вегетативных в РИФ имело преимущество перед бактериологическим методом (тест на гемолиз) при исследовании проб из объектов окружающей среды и биологического материала по времени постановки и учету результатов – 2,5-3 ч против 40 ч, что особенно важно при оперативном решении вопроса о проведении противоэпидемических мероприятий в очагах сибирской язвы.

В Инструкцию по применению иммуноглобулинов сибиреязвенных вегетативных внесено дополнение: «Ввиду наличия генетического родства

сибирязвенного микроба с другими представителями рода *Bacillus*, допускается лизис близкородственных штаммов не более, чем у 10 % от числа исследуемых». Учитывая, что выявление *B. anthracis* является сигнальным методом индикации и позволяет судить об ориентировочном обнаружении возбудителя, для подтверждения его принадлежности к возбудителю сибирской язвы, необходимо проводить комплексное исследование.

Таким образом, полученные результаты исследований свидетельствуют о высокой диагностической ценности иммуноглобулинов флуоресцирующих сибирязвенных вегетативных, что позволяет их использовать при исследовании чистых культур *B. anthracis*, биологического материала и объектов окружающей среды на этапе индикации в лабораторной диагностике сибирской язвы. Учитывая, что стандартизация лабораторной диагностики особо опасных инфекций требует использования в лабораториях территориального, регионального и федерального уровней зарегистрированных диагностических препаратов, несомненно, ценным является обоснование возможности применения иммуноглобулинов флуоресцирующих сибирязвенных вегетативных при проведении мониторинга за возбудителем сибирской язвы.

Определение диагностической ценности (специфическая активность, специфичность) иммуноглобулинов флуоресцирующих сибирязвенных спорных адсорбированных

Способность возбудителя сибирской язвы образовывать в окружающей среде высокоустойчивые споры обуславливает не только его длительное сохранение в анабиотическом состоянии, но и возможность размножаться и накапливаться в почве, что представляет угрозу заражения сибирской язвой людей и животных (Б.Л.Черкасский, 2004). В связи с этим совершенствование лабораторной диагностики сибирской язвы, направленное на выявление спорной формы возбудителя с помощью стандартных препаратов, обеспечивающих получение достоверных результатов, является своевременной.

Исследуемые иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие сибирязвенные спорные адсорбированные представляют собой иммуноглобулиновую фракцию к водорастворимому антигену спорной формы *B. anthracis*, выделенную из гипериммунной кроличьей сыворотки, адсорбированную на основе магнитоиммосорбентов водорастворимыми антигенами штаммов *B. cereus*. Препарат предназначен для обнаружения

споровой формы *B. anthracis* в реакции иммунофлуоресценции в мазках из чистых культур, объектах окружающей среды (почва, вода, корма, смывы) и биологического материала (мясо).

По внешнему виду и физико-химическим свойствам препарат соответствовал требованиям проекта нормативной документации. В результате проведенных испытаний установлена высокая диагностическая ценность иммуноглобулинов сибиреязвенных спорных по чувствительности РИФ и специфической активности. При просмотре 30 полей зрения в мазках наблюдали специфическое свечение с интенсивностью на 3-4 креста от 10 до 20 и более микробных клеток *B. anthracis* в концентрации $5,0 \cdot 10^5$ спор/мл.

При изучении специфической активности иммуноглобулинов сибиреязвенных спорных на 16 штаммах *B. anthracis* в концентрации $1,0 \times 10^8$ спор/мл в разведении 1:64 были выявлены 15 штаммов $93,8 \pm 6,0$ %, а в разведении 1:128 – 13 штаммов $81,2 \pm 9,8$ %. Это послужило основанием для установления истинного рабочего разведения иммуноглобулинов, которое составило 1:64.

Специфичность иммуноглобулинов изучали на 32 близкородственных штаммах. Показано, что в рабочем разведении 1:64 зарегистрировано свечение на 3 креста только с одним штаммом *B. cereus* 688В. Полученные данные свидетельствуют о том, что препарат обладает высокой специфичностью $96,9 \pm 3,1$ % (рис. 2).

Результаты изучения диагностической ценности иммуноглобулинов сибиреязвенных спорных в профильных учреждениях подтвердили их высокую диагностическую ценность. Установлено, что иммуноглобулины в разведении 1:64 выявляли спорную форму возбудителя сибирской язвы в пробах из объектов окружающей среды и биологического материала в 100 % случаев и специфически не окрашивали близкородственные микроорганизмы. При этом обнаружение штаммов *B. anthracis* с помощью иммуноглобулинов в РИФ и бактериологическим методом были равноценны.

Воспроизводимость результатов с помощью испытываемых иммуноглобулинов изучали в реакции иммунофлуоресценции. Для этого мазки, приготовленные из штамма *B. anthracis* (положительные пробы) и из штамма *B. cereus* (отрицательные пробы), окрашивали спорными иммуноглобулинами. Совпадение результатов наблюдали в 100 % случаев (табл. 2).

Явное преимущество постановки РИФ с помощью флуоресцирующих спорных иммуноглобулинов перед методом сравнения (тест на гемолиз) было установлено по времени учета результатов. Продолжительность проведения

исследований с помощью иммуноглобулинов составила 20 ч при исследовании чистых культур и 2,5-3 ч – проб из объектов окружающей среды и биологического материала.

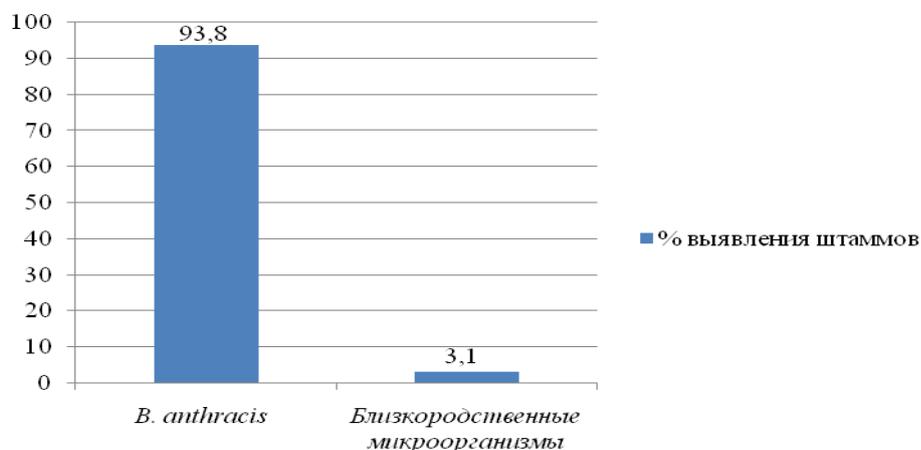


Рисунок 2 – Результаты специфической активности и специфичности иммуноглобулинов сибирязвенных спорных адсорбированных

С помощью теста на гемолиз результаты были получены через 20 ч при исследовании чистых культур и через 40 ч – при исследовании проб из объектов окружающей среды и биологического материала. Приведенные временные затраты в РИФ значительно ниже, чем при проведении исследований бактериологическим методом, что особенно важно при обнаружении спорной формы возбудителя сибирской язвы из объектов окружающей среды и биологического материала, а также при проведении мониторинга за возбудителем сибирской язвы.

Полученные результаты испытаний показали высокую диагностическую ценность иммуноглобулинов флуоресцирующих сибирязвенных спорных адсорбированных, обеспечивающих специфическое свечение штаммов *B. anthracis* в спорной форме в мазках из чистых культур, биологического материала и объектов окружающей среды. Учитывая трудоемкость и недостаточную стандартность бактериологического метода, использование РИФ имеет перед ним явные преимущества. Аналогично дополнениям, как и на иммуноглобулины сибирязвенные вегетативные, были внесены изменения (рабочее разведение, обеззараживание мазков, допустимый лизис близкородственных микроорганизмов) в проект нормативной документации на иммуноглобулины сибирязвенные спорные.

Таким образом, в результате проведенных испытаний установлена высокая специфическая активность и специфичность иммуноглобулинов сибирязвенных спорных и выявлено преимущество их использования в РИФ перед бактериологическим методом по времени учета результатов.

Таблица 2 – Результаты исследований иммуноглобулинов флуоресцирующих сибирязвенных спорных адсорбированных

№ п/п	Показатели	Количество проб	Результаты	
			иммуноглобулины флуоресцирующие в разведении 1:64	тест на гемолиз
1	Чувствительность (минимальное количество спор <i>B. anthracis</i> , выявляемое в РИФ),	5	$5,0 \times 10^5$ спор/мл	—*
2	Специфическая активность (процент правильно идентифицированных штаммов <i>B. anthracis</i>), $M \pm m$ %	16	$93,8 \pm 6,0$	100,0
3	Специфичность (процент отрицательных результатов с близкородственными микроорганизмами), %	32	$96,9 \pm 3,1$	100,0
4	Выявляемые штаммы <i>B. anthracis</i> в пробах объектов окружающей среды, $M \pm m$ %	225	100,0	—
5	Отрицательные результаты с близкородственными микроорганизмами в пробах объектов окружающей среды, $M \pm m$ %	225	100,0	—
6	Скорость учета результатов (с учетом подготовки всех материалов), часах	чистые культуры	20	20
		объекты внешней среды, биологический материал	2,5-3	40
Примечание: (—) – не предусмотрено методом				

Учитывая вышеизложенное можно сделать заключение, что испытываемый препарат может использоваться для индикации *B. anthracis* при исследовании проб из объектов окружающей среды и биологического материала в диагностике сибирской язвы лабораторий трехуровневой структуры (территориальная, региональная, федеральная).

Определение диагностической ценности сибирезвенного бактериофага Гамма А-26

Известно, что существующие сибирезвенные бактериофаги различаются по широте диапазона литического спектра в отношении штаммов *B. anthracis*, а также по специфичности их действия. Феномены чувствительности и фагорезистентности сибирезвенного микроба представляют интерес не только с точки зрения надежности теста фаголизабельности при идентификации сибирезвенных культур, но и как основа метода выделения штаммов *B. anthracis* с разной чувствительностью к действию бактериофагов (Головинская Т.М. и др., 2010, Рязанова А.Г. и др., 2010). Диагностическая ценность сибирезвенного бактериофага определяется, главным образом, диапазоном литического спектра, что позволяет оценить возможность его применения для идентификации возбудителя сибирской язвы. С этой целью проведены сравнительные исследования по изучению спектра литической активности и специфического действия сибирезвенного бактериофага Гамма А-26 с сибирезвенным бактериофагом Fah ВНИИВВиМ.

Сибирезвенный бактериофаг Гамма А-26 представляет собой стерильный фильтрат фаголизата бульонной культуры сибирезвенного штамма *B. anthracis* 228/8, содержащий взвесь частиц фага Гамма А-26, обладающих лизирующим действием в отношении типичных и атипичных штаммов *B. anthracis* в вегетативной форме. Препаратом сравнения служил бактериофаг сибирезвенный Fah ВНИИВВиМ (ветеринарный), который представляет собой фаголизат сибирезвенного штамма Шуя-15 в полусинтетической пептонно-дрожжевой жидкой среде.

Материалами для исследования служили музейные и выделенные из различных природных очагов штаммы *B. anthracis*, а также штаммы близкородственных микроорганизмов. В результате проведенных сравнительных испытаний выявлено, что бактериофаг Гамма А-26 по диагностической ценности превосходил бактериофаг Fah ВНИИВВиМ. С помощью бактериофага Гамма А-26 лизировалось 46 штаммов *B. anthracis* из 47 исследованных, что составило $97,9 \pm 2,1$ %. Препарат сравнения лизировал $89,4 \pm 4,5$ % штаммов *B. anthracis*, устойчивы к бактериофагу были 5 штаммов ($p=0,48$). Отмечено, что размер литического пятна бактериофага Гамма А-26 со штаммами *B. anthracis* был визуально больше, чем у бактериофага Fah ВНИИВВиМ, при этом отмечался более четкий лизис пятна.

Для изучения специфического действия бактериофагов в отношении близкородственных микроорганизмов было изучено 72 штамма других видов рода *Bacillus*. Выявлено, что из общего числа исследуемых штаммов 69 были резистентны к сибиреязвенному бактериофагу Гамма А-26, а 2 штамма лизировались исследуемым препаратом. Бактериофагом Fah ВНИИВВиМ лизировался только один из 72 штаммов близкородственных микроорганизмов. Диапазон литической активности бактериофага Гамма А-26 составил $95,8 \pm 2,36$ %, препарата сравнения – $98,6 \pm 1,38$ % ($p=0,35$). Результаты исследований бактериофагов отражены на (рис. 3, табл. 3).

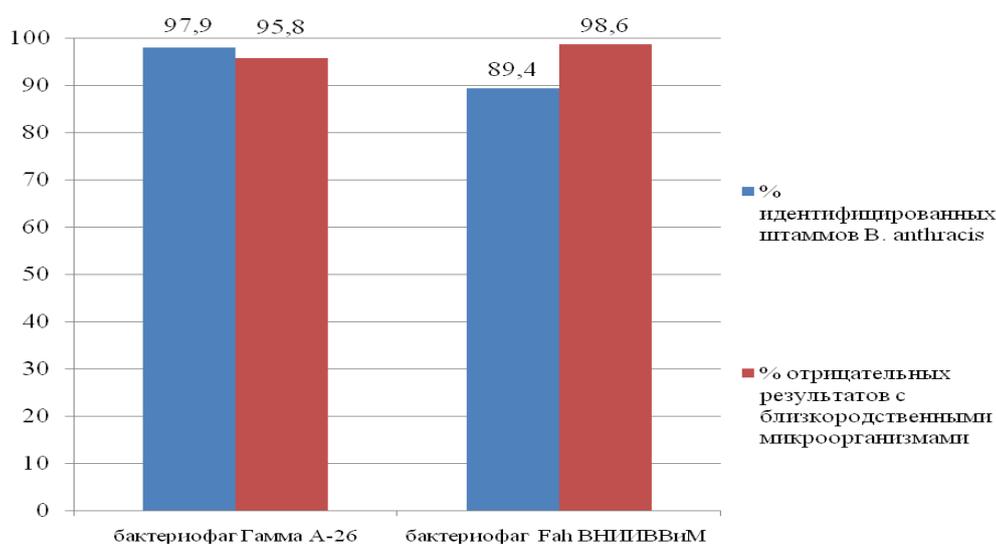


Рисунок 3 – Результаты определения литической активности и специфического действия бактериофагов Гамма А-26 и Fah ВНИИВВиМ

Следует отметить, что фаголизабельность не является строго специфичным видовым признаком, так как возбудитель сибирской язвы входит в группу близкородственных микроорганизмов рода *Bacillus* и имеет ряд общих свойств с другими ее представителями. В связи с этим выделяемые штаммы, не лизирующиеся сибиреязвенным бактериофагом, но по некоторым признакам соответствующие сибиреязвенному микробу, требуют дополнительных исследований в соответствии с методическими указаниями «Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы» (МУК 4.2.2413-08).

У всех выделенных культур, подозрительных на *B. anthracis*, необходимо определять их видовую принадлежность с применением дополнительных методов (обнаружение капсулы *in vitro*, тест на гемолиз, тест на чувствительность к пенициллину, подвижность и др.), что позволит

оптимизировать и значительно улучшить диагностику сибирской язвы на этапе идентификации возбудителя.

Проведенные эксперименты подтверждают, что методика изучения чувствительности штаммов *B. anthracis* к лизирующему действию сибирезвенного бактериофага Гамма А-26 является технически простой, информативной и легко воспроизводимой.

Полученные результаты явились основанием для внесения изменений в НД: включена предложенная нами методика постановки пробы при определении спектра литической активности бактериофага. С этой целью, для получения более четкого литического пятна рекомендовано растереть нанесенную каплю исследуемой культуры до диаметра 1,5 см на агаровой пластинке в чашке Петри.

Таблица 3 – Результаты определения диагностической ценности бактериофага сибирезвенного Гамма А-26 и бактериофага Fah ВНИИВВиМ

№ п/п	Показатели	Количество штаммов	Результаты		
			бактериофаг диагностический сибирезвенный Гамма А-26	сибирезвенный бактериофаг Fah ВНИИВВиМ	p
1	Процент идентифицированных штаммов <i>B. anthracis</i> к числу исследованных, М±m %	47	97,9±2,1	89,4 ±4,5	0,48
2	Процент отрицательных результатов при исследовании близкородственных микроорганизмов, М±m %	72	95,8 ±2,36	98,6 ±1,38	0,35
3	Воспроизводимость – процент совпадений результатов исследования положительных и отрицательных проб, М±m %	20	100,0	100,0	
4	Время учета результатов, процент правильности идентификации штаммов, (%)	119	(5±1) ч (предварительный учет), 100,0	(5±1) ч (предварительный учет), 100,0	
			(18±2) ч (окончательный учет), 100,0	(18±2) ч (окончательный учет), 100,0	

Полученные результаты явились основанием для внесения дополнений в инструкцию по применению бактериофага Гамма А-26 в отношении лизиса близкородственных штаммов – не более 5 % от числа исследуемых. Для

идентификации возбудителя сибирской язвы необходимо использовать применение сибирезвенного бактериофага в комплексе с другими методами.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о широком диапазоне литического спектра бактериофага сибирезвенного Гамма А-26 и подтверждают возможность его использования при идентификации штаммов *B. anthracis* в лабораториях территориального, регионального и федерального уровней.

ВЫВОДЫ

1. Установлена высокая специфическая активность иммуноглобулинов сибирезвенных вегетативных адсорбированных. Показано, что иммуноглобулины в разведении 1:64 обеспечивают специфическое свечение $93,8 \pm 6,0$ % штаммов *B. anthracis* в вегетативной форме. При исследовании проб из биологического материала (мясо животного) и объектов окружающей среды (смывы, вода, почва, корма), контаминированных *B. anthracis*, сибирезвенный микроб с помощью исследуемого препарата выявляется в 100 % случаев.

2. Проведенными исследованиями показано, что иммуноглобулины сибирезвенные споровые адсорбированные в разведении 1:64 обеспечивают специфическое свечение *B. anthracis* споровой формы в $93,8 \pm 6,0$ % мазков из чистых культур и в 100 % проб из биологического материала и объектов окружающей среды, при этом не вызывают специфического свечения со штаммами близкородственных микроорганизмов.

3. Установлено явное преимущество применения реакции иммунофлуоресценции с использованием испытываемых иммуноглобулинов в сравнении с бактериологическим методом (тест на гемолиз) в отношении временных затрат при индикации возбудителя сибирской язвы.

При исследовании проб объектов окружающей среды и биологического материала в РИФ с помощью иммуноглобулинов флуоресцирующих сибирезвенных вегетативных и споровых адсорбированных учет результатов проводят через 2,5-3 ч, бактериологическим методом (тест на гемолиз) – через 40 ч.

4. Диагностический препарат бактериофаг сибирезвенный Гамма А-26 обладает широким диапазоном действия к исследуемым штаммам *B. anthracis* и высокой специфичностью в отношении близкородственных микроорганизмов. Установлено, что сибирезвенный бактериофаг Гамма А-26 лизировал $97,9 \pm 2,1$ % штаммов *B. anthracis* из 47 исследуемых и был не активным в отношении 69 штаммов $95,8 \pm 2,36$ % близкородственных

микроорганизмов из 72 исследуемых. При учете результатов установлено, что бактериофаг сибирезвенный Гамма А-26 превосходит препарат сравнения по четкости лизиса.

5. Проведенными исследованиями обоснована возможность использования сибирезвенных препаратов иммуноглобулинов флуоресцирующих (вегетативные и споровые) адсорбированных и бактериофага Гамма А-26 для индикации и идентификации *B. anthracis* в лабораторной диагностике сибирской язвы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Саяпина Л.В., **Лобач Р.Н.**, Абдрашитова А.С., Комратов А.В., Малахаева А.Н., Лешова О.Ю., Валова Т.В., Храмов М.В., Гефан Н.Г. Диагностическая эффективность иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих сибирезвенных вегетативных адсорбированных по данным медицинских испытаний // Журнал Проблемы особо опасных инфекций.- 2012.- 4(114).- С. 92-96.
2. **Лобач Р.Н.**, Саяпина Л.В., Абдрашитова А.С., Лешова О.Ю., Валова Т.В., Храмов М.В., Гефан Н.Г., Бондарев В.П. К вопросу об индикации возбудителя сибирской язвы иммуноглобулинами флуоресцирующими сибирезвенными споровыми адсорбированными // Журнал Жизнь без опасностей. Здоровье. Профилактика. Долголетие.- 2013.- 2(VII).- С. 46-51.
3. Саяпина Л.В., **Лобач Р.Н.**, Абдрашитова А.С., Никитюк Н.Ф. Совершенствование лабораторной диагностики сибирской язвы // Военно-медицинский журнал.- 2013.- 8(334).- С. 58-59.
4. **Лобач Р.Н.**, Абдрашитова А.С., Саяпина Л.В. Испытания сибирезвенных флуоресцирующих иммуноглобулинов, предназначенных для выявления возбудителя сибирской язвы // Журнал Биопрепараты.- 2013.- №4(48).- С. 29-33.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ИФА – иммуноферментный анализ

МФА – метод флуоресцирующих антител

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНГА – реакция непрямой гемагглютинации

РИФ – реакция иммунофлуоресценции

Лобач Роман Николаевич (Россия)

«Диагностическая ценность сибирезвенных иммуноглобулинов и бактериофага Гамма А-26 при выявлении и идентификации возбудителя сибирской язвы»

Диссертационная работа посвящена изучению диагностической ценности (специфическая активность, специфичность, воспроизводимость) сибирезвенных иммуноглобулинов флуоресцирующих вегетативных и споровых адсорбированных, и бактериофага Гамма А-26. Актуальность работы обусловлена отсутствием зарегистрированных диагностических препаратов. Сложившиеся условия требуют проведения лабораторной диагностики с целью индикации возбудителя сибирской язвы зарегистрированными диагностическими препаратами. Проведенными исследованиями обоснована возможность использования сибирезвенных диагностических препаратов для индикации и идентификации *Bacillus anthracis* в лабораторной диагностике сибирской язвы.

Lobach Roman Nikolayevich (Russia)

«Diagnostic value of anthrax immunoglobulin and bacteriophage Gamma A-26 in the detection and identification anthrax»

The dissertation research is devoted to the study of diagnostic value (specific activity, specificity, reproducibility) of anthrax immunoglobulin fluorescent vegetative and spore adsorbed, and bacteriophage Gamma A-26 of indication and identification of anthrax. Relevance of the work due to lack of diagnostic products registered. Current conditions require laboratory diagnosis to indicate the anthrax registered diagnostic preparations. Conducted research proved the possibility of using anthrax diagnostic products for indication and identification of *Bacillus anthracis* in the laboratory diagnosis of anthrax.