DOI <http://dx.doi.org/10.18551/rjoas.2016-02.01>

**ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ И ПРАКТИЧЕСКОЙ ПРИГОДНОСТИ СОВРЕМЕННЫХ
МЕТОДОВ ЭКСПРЕСС-ИНДИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ**
EVALUATION OF EFFECTIVENESS AND FEASIBILITY OF UP-TO-DATE METHODS
FOR ANTHRAX RAPID INDICATION

Егорова И.Ю.*, доктор ветеринарных наук

Egorova I.Y., Doctor of Veterinary Sciences

Селянинов Ю.О., доктор биологических наук

Selyaninov Y.O., Doctor of Biological Sciences

ВНИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии,

Владимирская область, Россия

All-Russian Research Institute for Veterinary Virology and Microbiology,

Vladimir Region, Russia

Ковалева Е.Н., кандидат биологических наук

Kovaleva E.N., Candidate of Biological Sciences

Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина, Ульяновск, Россия

Ulyanovsk State Agricultural Academy named after P.A. Stolypin, Ulyanovsk, Russia

*E-mail: vniiivvim@niiv.petush.elcom.ru

АННОТАЦИЯ

Целью данного исследования являлось сравнительное изучение специфичности и чувствительности современных методов экспресс-индикации и идентификации *B.anthraxis*, а также оценка их пригодности для включения в схему лабораторной диагностики сибирской язвы. Изучение селективных и дифференциально-диагностических свойств питательных сред, апробацию и внутрилабораторную валидацию тест-системы Microgen Bacillus ID, оценку специфичности и чувствительности иммунохроматографических тестов (ИХа-тесты), иммуноглобулинового эритроцитарного диагностикума и сибиреязвенных бактериофагов Fah-ВНИИВВиМ и R/D-Ph-6 проводили согласно инструкции по их применению с использованием панели микроорганизмов из специально отобранных полевых изолятов и вакцинных штаммов *B.anthraxis*, а также близкородственных сапрофитов рода *Bacillus* с различной степенью сходства по фенотипическим, генетическим и антигенным свойствам. Результаты испытаний показали, что большинство из предлагаемых методов экспресс-индикации возбудителя сибирской язвы, основанных на применении селективных дифференциально-диагностических питательных сред, выявлении специфических антигенов и рецепторов патогена, различий в биохимической активности не имеют практической значимости при проведении лабораторных диагностических исследований в силу их низкой чувствительности, воспроизводимости, информативности, а также высоких трудовых и материальных затрат. Из всех испытанных методов внимания заслуживают среды, основанные на выявлении фосфатазной активности и новый сибиреязвенный фаг R/D-Ph-6.

ABSTRACT

This research work was aimed at comparison of specificity and sensitivity levels of up-to-date methods for *B.anthraxis* rapid indication and identification, as well as estimation of their feasibility to be used in the scheme of anthrax laboratory diagnostics. A study of selective and differential diagnostic characteristics of culture media, approbation and intralaboratory validation of a test system Microgen Bacillus ID, and evaluation of immunochromatographic tests (IC-tests), an immunoglobulin erythrocyte diagnosticum and anthrax bacteriophages Fah-VNIIVViM and R/D-Ph-6 for their specificity and sensitivity levels was performed in

accordance with instructions for their application using a panel of microorganisms of specially selected *B.anthraxis* field isolates and vaccine strains, and closely related saprophytes of genus *Bacillus* with various degrees of similarity with respect to their phenotypic, genetic and/or antigenic specificities. The obtained results showed that the most of the presented methods for anthrax rapid indication based on using differential diagnostic selective culture media, identification of specific antigen and/or pathogen receptors of the pathogen, and the differences in biochemical activity levels had no practical significance for laboratory diagnostic practice due to their low sensitivity & reproducibility rates and informative value, as well as high labor and material costs. Among the methods tested, only the media based on phosphatase activity detection, and a new anthrax phage R/D-Ph-6 are noteworthy.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

B.anthraxis, экспресс-индикация, чувствительность, специфичность, дифференциация.

KEY WORDS

B.anthraxis, rapid indication, sensitivity, specificity, differentiation.

Принятие своевременных и адекватных мер по профилактике и ликвидации особо опасных и опасных болезней животных зависит во многом от того, насколько быстро будет обнаружен патоген. При этом решающее значение приобретают методы экспресс- и ускоренной диагностики, обладающие высокой чувствительностью и специфичностью, позволяющие осуществлять детекцию патогенов в максимально короткие сроки.

Однако процесс разработки и совершенствования эффективных методов индикации и идентификации осложняется тем, что, возбудители сапрозоонозов, к которым относится и сибиреязвенный микроб, приспосабливаются к воздействию многочисленных физико-химических и биологических факторов абиотической среды изменением своих свойств. Так, из почв скотомогильников нередко выделяют изоляты, отличающиеся от типичных сибиреязвенных, морфологией, вирулентностью, биохимической активностью, спектру чувствительности к бактериофагам и антибиотикам способностью к споро-, токсино- и капсулообразованию и др. [3, 4, 8, 10, 17]. В связи с этим, при установлении видовой принадлежности изолятов *B.anthraxis* с атипичными свойствами возникают определенные трудности, которые усугубляются наличием в почве, особенно в летне-осенний период, большого количества аэробных бацилл, принадлежащих, в основном, к группам *B.cereus* и *B.subtilis* [19].

Для решения проблемы индикации и идентификации исследователи конструируют питательные среды, обладающие высокими селективными и дифференциально-диагностическими свойствами, разрабатывают методы выявления специфических антигенов, нуклеотидных последовательностей и определения различий в биохимической активности. Как правило, повышение селективности сред достигается за счет добавления к питательной основе химических препаратов с избирательным антимикробным действием, хромогенных субстратов, позволяющих дифференцировать микроорганизмы по биохимической активности, биостимуляторов для ускоренного получения и частичной идентификации бактериальной культуры, значительным смещением pH и т.п. Так, для выделения возбудителя сибирской язвы и представителей группы *Bacillus cereus* ветеринарной и медицинской практике предложен широкий арсенал селективных и дифференциально-диагностических питательных сред – дифференциально-диагностическая среда для выделения и культивирования сибиреязвенного микроба (СБК), PLET-агар, среда для диагностики сибирской язвы (АДЭСБ), среда с сорбитом и бромтимоловым синим, диагностическая среда для выделения возбудителя сибирской язвы и близкородственных бацилл группы *Bacillus cereus*, среда Донована и *Bacillus cereus* селективный агар Мозеля (МYP-агар). Для обнаружения специфических сибиреязвенных антигенов в дополнение к реакции Асколи исследователями предлагается эритроцитарный иммуноглобулиновый диагностикум, иммуноглобулины диагностические

сибиреязвенные вегетативные и споровые адсорбированные флуоресцирующие (ФГУЗ СтавНИПЧИ), иммунохроматографический тест (ФГУП ГНЦ ПМБ, п. Оболенск), для выявления специфических нуклеотидных последовательностей - набор реагентов «АмплиСенс® *B.anthraxis-FRT*» (ФГУН ЦНИИЭ и ФГУЗ «РосНИПЧИ «Микроб»), а для биохимической идентификации представителей рода *Bacillus* тест-система Microgen *Bacillus ID*. Поскольку лизабельность сибиреязвенными бактериофагами в соответствии с МУК 4.2.2413-08 является одним из трех опорных тестов, практике, в дополнение к фагу *Fah*-ВНИИВВиМ (ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии, п. Вольгинский) предложен новый сибиреязвенный бактериофаг «R/D-RH-6» (ФГУП ГНЦ ПМБ, п. Оболенск), который предлагается использовать в реакции определения чувствительности к фагу и в реакции нарастания титра фага для выявления *Bacillus anthracis* в смешанных культурах, а также объектах внешней среды.

Несмотря на разработку значительного числа новых методов, их место в схеме индикации и идентификации сибиреязвенного микроба до настоящего времени не определено, как не определена и их практическая значимость.

Цель исследования. Учитывая изложенное целью данных исследований являлось сравнительное изучение специфичности и чувствительности современных методов экспресс-индикации и идентификации *B.anthraxis*, а также оценка их пригодности для включения в схему лабораторной диагностики сибирской язвы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для получения достоверных результатов о специфичности и эффективности методов экспресс-индикации сибиреязвенного микроба, основанных на выявлении различных специфических мишеней, в работе использовали панель микроорганизмов из специально отобранных полевых изолятов и вакцинных штаммов *B.anthraxis*, а также близкородственных сапрофитов рода *Bacillus* с различной степенью сходства по фенотипическим, генетическим и антигенным свойствам [7].

Изучение селективных и дифференциально-диагностических свойств питательных сред (среда с бромтимоловым синим и сорбитом, среда для выделения и культивирования сибиреязвенного микроба (СВК), диагностическая среда для выделения возбудителя сибирской язвы и близкородственных бацилл группы *Bacillus cereus*, агары Мозеля и Донована для селективной изоляции *Bacillus cereus*) проводили с использованием микроорганизмов в споровой форме. Полученные результаты интерпретировали согласно инструкций по применению каждой дифференциально-диагностической питательной среды.

При апробации и внутрилабораторной валидации тест-системы Microgen *Bacillus ID* использовали 18-24 ч вегетативные культуры исследуемых микроорганизмов. Приготовление инокулюма, засев стрипов и учет результатов проводили согласно инструкции по применению тест-системы. Видовую принадлежность культур определяли с помощью программного обеспечения по цифровому коду, полученному при тестировании патогена.

Иммунохроматографические тесты (ИХа-тесты) испытывали с применением споровых суспензий сибиреязвенного микроба и близкородственных сапрофитов с концентрацией 10^8 спор/см³ и более, приготовленных на основе ЗФР (рН 7,4). Постановку теста и учет результатов осуществляли согласно инструкции по применению теста.

Сравнительное изучение диагностической эффективности бактериофагов *Fah*-ВНИИВВиМ и R/D-Ph-6 проводили с использованием 4-х часовых бульонных культур микроорганизмов, выращенных в бульоне Хоттингера. Постановку теста осуществляли согласно инструкции по применению каждого из фагов. *Fah*-ВНИИВВиМ применяли в концентрации 10^8 фаговых корпускул/см³, R/D-Ph-6 – 10^6 фаговых корпускул/см³. В качестве индикаторного штамма при индикации сибиреязвенного микроба в объектах внешней среды с применением фага R/D-Ph-6 использовали вакцинный штамм СТИ-1 МО из коллекции микроорганизмов ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии.

Испытание эритроцитарного иммуноглобулинового диагностикума проводили согласно инструкции по применению с использованием спорых суспензий сибиреязвенного микроба и близкородственных сапрофитов с концентрацией 10^8 спор/см³, приготовленных на основе ЗФР (рН 7,4).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследований, на основании анализа паспортных данных различных культур сибиреязвенного микроба, сформировали группу полевых изолятов *B. anthracis*, выделенных в пространственно отдаленных друг от друга регионах, различающихся по времени и объектам выделения.

Наибольшее число использованных в работе культур возбудителя сибирской язвы выделено от павшего КРС и МРС (5 изолятов), 2 - от свиньи и 1 - от лошади. В одном случае вид животного, от которого выделен возбудитель, не известен. Пять изолятов выделено из почв. По срокам выделения изоляты распределились следующим образом: свежесделенные (до двух лет) – 7, выделенные от 3 до 10 лет назад – 1, от 11 до 20 лет – 1 и свыше 30 лет назад – 7 изолятов.

Изоляты имели сходные фенотипические свойства: на мясо пептоном агаре (МПА) формировали колонии R-формы, за исключением одного изолята, образующего колонии в RR-форме, в мясо пептоном бульоне (МПБ) бульон наблюдали рост в виде сеточки, длинных нитей и «комка ваты». Из 16 изолятов 3 были атипичны по признаку капсулообразования *in vivo* и *in vitro*, при этом в геноме одного из этих изолятов методом ПЦР обнаружены специфические последовательности *cap*-гена; 2 изолята не лизировались специфическим сибиреязвенным бактериофагом *Fah*-ВНИИВВиМ, а для двух культур наблюдали слабopоложительную реакцию (наличие вторичного роста и единичных колоний в зоне нанесения фага).

По патогенности для белых аутбредных мышей изоляты распределились в 3 группы: высоковирулентные (10^4 - 400 спор) – 8 изолятов; вирулентные (10^3 спор) – 2 изолята; умеренновирulentные и авирулентные (10^5 спор и выше) - 4 изолята.

В сравнительных исследованиях также использовали вакцинные сибиреязвенные штаммы и штаммы близкородственных сапрофитов обладающих набором антигенов, сходных с антигенами возбудителя сибирской язвы, а также содержащих фрагменты генов основных факторов патогенности (*cap*- и *pag*-гены) *B. anthracis*, выделенные нами при проведении лабораторных диагностических исследований и исследовании объектов внешней среды.

На втором этапе исследований оценивали дифференциально-диагностические и селективные свойства питательных сред, предназначенных для изоляции, идентификации и дифференциации представителей рода *Bacillus*. Оценке подвергали среды, в основу которых заложены принципы дифференциации микроорганизмов по их биохимической активности, в частности, продукции щелочной фосфатазы (СВК и ДС-р-NPP), ферментации углеводов (агар с сорбитом и рН-индикатором, тест-система для биохимической идентификации *Bacillus*-ID) и лецитина куриного желтка (среда Донована, МYP-агар).

В сравнительных испытаниях установлено, что среды разного состава отличаются между собой по селективным и дифференциально-диагностическим свойствам. Результаты представлены в таблице 1.

Наиболее высокими селективными и дифференциально-диагностическими свойствами обладали среды СВК и ДС-р-NPP. Высокая избирательность этих сред достигалась за счет введения в состав селективных агентов, активных против большинства микроорганизмов бактериальной и грибной природы. Сравнительное изучение диагностической эффективности среды СВК различных производителей (НПО «Питательные среды», г. Махачкала; ГНЦ ПМ, п. Оболенск; ФГУП «Аллерген», г. Ставрополь) проведенное нами ранее [6] показало, что наряду с высокими дифференциально-диагностическими свойствами среды СВК эффективность выявления фосфатазной активности на ней варьировала в зависимости от

предприятия-производителя этой среды. У новой хромогенной среды (ДС-р-NPP) [15] дифференциально-диагностические свойства были несколько ниже чем у агара СВК: у двух из 11 полевых изолятов *B.anthraxis* появлялось желтое окрашивание среды под колониями с радиусом 1-1,5 см. При этом на данной среде полностью подавлялся рост *B.megaterium* 2550 и *B.subtilis* ATCC 6633 за счет наличия в составе среды таких селективных агентов как цефтазидим и амфотерицин В. По нашему мнению, данная среда непригодна для использования при исследовании объектов внешней среды, имеющих высокую степень обсеменения представителями группы *B.cereus*. Отбор колоний, подозрительных как сибиреязвенные, на данной среде будет затруднен вследствие того, что они могут попадать в зону окрашивания среды, вызванную сапрофитами, приводя тем самым к ложной оценке их принадлежности к сапрофитам, а не к виду *B.anthraxis*. В данном случае наиболее объективные результаты о продукции фосфатазы позволяет получать СВК, на которой наблюдается изменение цвета непосредственно у самой колонии.

Таблица – 1 Селективные и дифференциально-диагностические свойства сред разного состава

Наименование питательной среды	Дифференцирующий признак	Селективные свойства	Дифференциально-диагностические свойства
Среда для выделения и культивирования сибиреязвенного микроба (СВК)	продукция щелочной фосфатазы	+++	+++
Питательная среда, содержащая хромоген р-NPP – динатриевую соль пара-нитрофенилфосфата (ДС-р-NPP)	продукция щелочной фосфатазы	+++	++
Питательная среда с сорбитом и рН-индикатором	ферментация сорбита	-	+
Среда Донована	ферментация лецитина куриного желтка	+	+
МYP-агар	ферментация лецитина куриного желтка и маннита	+	++
Тест-система для биохимической идентификации Bacillus-ID	комплекс из 24 тестов	-	++

Примечание: «+» - низкие; «++» - средние; «+++» - высокие; «-» - среда предназначена для работы с чистыми культурами.

Самые низкие дифференциально-диагностические свойства установлены для агара с сорбитом и рН-индикатором. По данным разработчиков [13] данная среда позволяет не только дифференцировать сибиреязвенный микроб от близкородственных сапрофитов, но и проводить дифференциацию первых по вирулентности: вирулентные сибиреязвенные штаммы должны формировать колонии желто-зеленого цвета с ярким ореолом вокруг них; аттенуированные сибиреязвенные штаммы - колонии зеленого цвета; близкородственные сапрофиты - колонии сине-зеленого цвета. Результаты наших исследований оказались не столь однозначными: колонии желто-зеленого цвета формировали 41,7% вирулентных изолятов, 25% аттенуированных, 11,1% близкородственных сапрофитов; зеленого цвета – 50 % вирулентных изолятов, 20,8 % аттенуированных, 66,7 % сапрофитов; сине-зеленого цвета – 8,3 % вирулентных изолятов, 54,2 % аттенуированных и 22,2 % сапрофитов. Таким образом, способностью утилизировать сорбит обладали как сибиреязвенные культуры, так и культуры близкородственных спорообразующих сапрофитов, что затрудняло их дифференциацию. Необходимо отметить и то, что учет результатов, основанный на цветовом восприятии, является несколько субъективным.

Примерно такие же характеристики дифференциально-диагностических свойств получены для среды Донована и МYP-агара. Результаты испытаний показали, что на обеих средах представители группы *B. cereus* ферментируют лецитин куриного желтка. Зона ферментации для отдельных видов составляла 3-5 мм от края колонии. На среде

Донована 6 из 13 изученных сибиреязвенных штаммов вызывали формирование зоны преципитации 1-2 мм от края колонии, а на МYP-агаре этой способностью обладали 3 сибиреязвенных штамма. При этом все без исключения представители группы *B. cereus* не ферментировали маннит – не изменяли цвета колонии под средой.

Для последних 3-х питательных сред также характерны либо слабые селективные свойства (в качестве селективного агента использован Полимиксин-Б), либо их отсутствие (применяются только для работы с чистыми культурами). В связи с чем, данные питательные среды могут использоваться только в качестве дополнительной характеристики выделяемых изолятов группы *B. cereus* и не представляют диагностической ценности в лабораторной диагностике сибирской язвы.

Надежно идентифицировать и дифференцировать представителей группы *B. cereus*, в которую согласно современной таксономии входит и возбудитель сибирской язвы, от других представителей рода *Bacillus* удалось с использованием микротест-системы производства Microgen Bioproducts LTD (Великобритания) - Microgen Bacillus-ID, в которой тестируется биохимическая активность микроба по 24 показателям. Результаты исследований показали, что культуры сапрофитов, полученные из официальных коллекций, в основном, соответствовали заявленному виду, и процент соответствия согласно их цифровых профилей находился на уровне 94,1-99,9%. При идентификации штаммов/изолятов сибиреязвенного микроба с долей достоверности от 59,2 до 95,5% они отнесены к группе *Bacillus cereus*. Анализ результатов идентификации сибиреязвенных культур показывает, что относительно низкий процент подобия некоторых штаммов с другими представителями группы *Bacillus cereus* обусловлен отсутствием ферментативной активности в отношении аргинина – изоляты *Bacillus anthracis* не ферментируют аргинин. Основные отличия между сибиреязвенными штаммами заключались в их способности ферментировать целлобиозу, салицин и инозитол.

В целом, в результате исследований также установлена низкая диагностическая значимость изученной микротест-системы, однако, по нашему мнению, она может быть использована для целей нумерической таксономии при проведении эпидемиологического расследования и классификации/систематизации бактериальных коллекций.

После определения диагностической значимости современных питательных сред на следующем этапе была проведена сравнительная оценка чувствительности и специфичности коммерческих сибиреязвенных фагов. В испытаниях использовали бактериофаги Fah-ВНИИВВиМ (ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии, п. Вольгинский) и R/D-Ph-6 (ФГУП ГНЦ ПМБ, п. Оболенск). По данным различных авторов указанные фаги отличаются по спектру литического действия и специфичности [2, 5, 9, 11, 12, 18, 20]. При этом результаты определения литической активности фагов различными исследователями в отношении штаммов *B. anthracis* и близкородственных бацилл не всегда однозначны [14] и зависят от используемых панелей микроорганизмов. В наших исследованиях также было установлено, что сибиреязвенные бактериофаги отличаются по спектру литического действия в отношении вакцинных штаммов и полевых изолятов *B. anthracis*. Так, фаг R/D-Ph-6 лизировал 18 из 20 испытанных сибиреязвенных штаммов, в то время как Fah-ВНИИВВиМ – 17 из 20. Однако при испытании фага R/D-Ph-6 уровень его взаимодействия с различными штаммами варьировал. У 6 штаммов реакция оценивалась на два креста, а у трех – в один крест, что выражалось в отсутствии зоны сливного лизиса культуры фагом, но наличием в зоне нанесения фага изолированных стерильных пятен. При повышении концентрации фага R/D-Ph-6 до 10^7 и 10^8 фаговых корпускул/см³ (ф.к./см³) наблюдалось формирование чистых зон лизиса даже на монослое культур штаммов, ранее оцененных как фагорезистентные. По специфичности оба фага не отличались: не вступали во взаимодействие с вегетативными клетками сапрофитов, за исключением *Bacillus polymyxa* 313/04, выделенного нами из пробы почвы, подозреваемой в контаминации сибиреязвенным микробом. На месте нанесения фагов на монослой 4-х часовой культуры *Bacillus polymyxa* отсутствовала зона сливного лизиса, но при этом

наблюдалось наличие изолированных стерильных пятен диаметром 0,5-1 мм. Таким образом, результаты проведенных испытаний показали, что сибиреязвенные бактериофаги Fah-ВНИИВВиМ и R/D-Ph-6 не отличаются по специфичности, но имеют различия в спектре литического действия при испытании их на панели штаммов/изолятов коллекции ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии. Спектр литического действия на испытанной панели для фага R/D-Ph-6 составил 100% (при концентрации $10^7 - 10^8$ корпускул/см³), тогда как для Fah-ВНИИВВиМ он находился на уровне 84,2%.

Учитывая полученные нами данные по уровню взаимодействия с различными сибиреязвенными штаммами фага R/D-Ph-6 в концентрации 10^6 корпускул/см³, считаем целесообразным предложить разработчикам этого фага внести изменения в инструкцию по его применению с указанием на то, что при получении сомнительных результатов проба фагом ставится повторно с использованием фага в концентрации 10^8 корпускул/см³.

На следующем этапе исследований оценивали способность фага R/D-Ph-6 к индикации сибиреязвенного микроба в объектах внешней среды на примере почвенных образцов с использованием реакции нарастания титра фага. В предварительных экспериментах было установлено, что минимальное количество спор сибиреязвенного микроба, способное обеспечивать нарастание титра фага более чем на 25% (процент ошибки титрования по Грациа) соответствует 100 спорам/см³ (табл. 2).

Таблица 2 - Нарастание титра фага R/D-Ph-6 при различном содержании спор индикаторного штамма *B.anthraxis* СТИ-1 МО

Содержание спор индикаторного штамма	Исходное содержание фага, ф.к./см ³	Титр фага, ф.к./см ³
100	2,0x10 ⁵	4,51x10 ⁷
1000		7,24 x10 ⁷
10000		1,5 x10 ⁸
100000		4,43 x10 ⁸

При содержании в испытуемом образце 100 спор сибиреязвенного микроба происходит достоверное нарастание титра фага (99,8%), что полностью согласуется с данными О.И. Цыганковой с соавт. [2], показавших в модельных опытах с почвенными вытяжками увеличение титра фага R/D-Ph-6 на 1-2 порядка при исходном содержании спор в образце 10^2 /см³. При проведении серии экспериментов с использованием искусственно загрязненных смесью спор *B.anthraxis* штамма Sterne и *B. cereus* 96 в соотношении 1:1000 образцов почв. В качестве контрольных проб использовали почвенные образцы, загрязненные отдельно спорами *B.anthraxis* штамма Sterne, *B. cereus* 96 и *B. polumuxa* 313/04 с таким расчетом, чтобы в 0,1 см³ почвенной вытяжки содержалось не менее 100 спор патогена. Контроль размножения фага проводили в «холостой» пробе – бульон Хоттингера, загрязненный 100 спорами штамма СТИ-1 МО. Пробы почвы к микробиологическому исследованию готовили в соответствии с МУК 4.2.2413-08. Индикацию сибиреязвенного микроба в тесте нарастания титра фага проводили, как описано у О.И. Цыганковой с соавт. [2] за исключением того, что бактериофаг вносился в концентрации 1×10^7 ф.к./см³, а время инкубации составляло 12-16 часов.

В результате проведения серии экспериментов нам не удалось получить воспроизводимые результаты. В параллельных исследованиях в части проб, содержащих споры *B.anthraxis*, наблюдали нарастание титра фага на 1,0-2,0 lg ф.к./см³, а у другой части проб этот феномен не проявлялся. Причины этого явления нам установить не удалось. В пробах, содержащих споры близкородственных сапрофитов, нарастание титра фага не регистрировалось.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о возможности обнаружения возбудителя сибирской язвы в объектах внешней среды с использованием реакции нарастания титра фага, но при этом следует учитывать низкую воспроизводимость метода, необходимость наличия в лаборатории

индикаторного штамма сибиреязвенного микроба (тест-система индикаторным штаммом не комплектуется), а результаты реакции должны подтверждаться выделением культуры возбудителя. Также данная тест-система не позволяет получать объективную информацию об эпизоотической значимости (капсульный/бескапсульный изолят) обнаруживаемого патогена, необходимую для проведения адекватных ограничительных мероприятий.

Помимо индикации в образцах почвы спор *B. anthracis* реакцией нарастания титра фага, последние, по мнению разработчиков, можно обнаружить и при помощи эритроцитарного сибиреязвенного иммуноглобулинового диагностикума, разработанного в ФГУ «48 НИИ микробиологии» МО РФ (г. Киров). Согласно инструкции по применению препарат не должен выявлять в РНГА культуры представителей групп *B. cereus* и *B. subtilis*, а также *B. megaterium* в концентрации $1,0 \times 10^8$ спор/см³ и обнаруживать присутствие спор сибиреязвенного микроба в концентрации $1,56 \times 10^6$ спор/см³. Оценку специфичности и чувствительности эритроцитарного диагностикума проводили на панели из 5 вакцинных, 10 полевых изолятов *B. anthracis* и 2 близкородственных сапрофитов.

Результаты испытаний показали, что споры большинства сибиреязвенных штаммов обнаруживались в концентрациях от $4,9 \times 10^4$ до $1,56 \times 10^6$ спор/см³ и лишь у одного вакцинного штамма Ихтиман – в концентрации $6,25 \times 10^6$ спор/см³, что свидетельствовало об особенностях антигенного состава данного штамма. При этом споры изолята *B. polytuxa* 313/04, выделенного нами из пробы почвы, подозреваемой в заражении возбудителем сибирской язвы и имеющего высокую степень антигенного родства с возбудителем сибирской язвы, вызывали агглютинацию сенсibilизированных сибиреязвенными иммуноглобулинами эритроцитов в концентрации $1,95 \times 10^5$ спор/см³.

Основной недостаток данного медицинского иммунобиологического препарата (МИБП) это необходимость использования для постановки РНГА чистой споровой культуры *B. anthracis*, получение которой в среднем может занимать от 7 до 10 суток (изоляция чистой вегетативной культуры и перевод её в споровое состояние). За такой период времени проводится окончательная идентификация патогена по комплексу основных и дополнительных лабораторных тестов с постановкой биопробы. Прямое применение МИБП для индикации спор в объектах внешней среды затруднено целым рядом причин: во-первых - ничтожно малой вероятностью нахождения патогена в вытяжках из проб объектов внешней среды в концентрации $1,56 \times 10^6$ спор/см³ (с учетом того, что в среднем эффективность изоляции патогена из проб почвы составляет 10%) и, во-вторых, наличием в природе близкородственных сапрофитов, имеющих высокую степень антигенного родства с сибиреязвенным микробом. Так, при исследовании нами в 2004 году проб почвы с территории скотомогильника в одном из районов Московской области, из 491 отобранной культуры сапрофитов 18 вступали во взаимодействие со специфической преципитирующей сибиреязвенной сывороткой, что свидетельствовало о наличии у них перекрестно реагирующих антигенов.

Сходные результаты получены и при использовании иммунохроматографических тестов (ИХ-тест) производства ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора, в которых антиспоровые антитела, меченные золотом, помещены на сборную фильтрационную полосу [16]. Показано, что «ИХ-тест *B. anthracis*» выявлял 11 из 15 сибиреязвенных культур в пробах с концентрацией 10^8 спор/см³ (таблица 3).

Повышение концентрации спор до 10^9 спор/см³ (для некоторых культур) приводило к появлению полосы в тестовой зоне «Т», окрашенной в слабо-розовый или розовый цвет. При этом формирование полосы регистрировали в течение 15-20 мин, что соответствовало требованиям инструкции по применению этих тест-систем. Полученные нами результаты согласовываются с данными А.А. Зайцева с соавт. [1], показавшими при испытании «ИХ-тест *Francisella tularensis*» и «Тест-полоска *F. tularensis*» на панели возбудителя туляремии и близкородственных микроорганизмов, что концентрация взвеси микробных клеток туляремийного микроба оказывает существенное влияние на результат реакции. Так, у взвесей с концентрацией 1×10^7

м.к./см³ обычно наблюдали слабо прокрашенные полосы, в то время как у взвесей с концентрацией 1×10^8 и 1×10^9 м.к./см³ – преимущественно четкие полосы, окрашенные в розовый или насыщенно красный цвет.

Также необходимо отметить, что иммобилизованные на сборных фильтрационных полосках антитела вступали во взаимодействие с перекрестными антигенами *B. polymyxa* 313/04 - наблюдалось формирование слабо прокрашенной в розовый цвет полосы в тестовой зоне «Т».

Таблица 3 - Индикация и идентификация спор *B.anthraxis* с применением различных иммунохроматографических тестов

№ п/п	Наименование штамма/изолята	Содержание спор в образце, спор/см ³	Результат индикации и идентификации <i>B.anthraxis</i> с использованием	
			ИХ-тест <i>B.anthraxis</i>	Тест-полоска <i>B.anthraxis</i>
1.	<i>B.anthraxis</i> 30	10^8	обнаружен	обнаружен
2.	<i>B.anthraxis</i> 113	10^8	обнаружен	обнаружен
3.	<i>B.anthraxis</i> 115	10^8	обнаружен	обнаружен
4.	<i>B.anthraxis</i> 317	10^8	обнаружен	обнаружен
5.	<i>B.anthraxis</i> 355	10^8	обнаружен	обнаружен
6.	<i>B.anthraxis</i> 362	10^8	обнаружен	обнаружен
7.	<i>B.anthraxis</i> 363/11	10^8	обнаружен*	обнаружен*
		10^9	обнаружен	обнаружен
8.	<i>B.anthraxis</i> 364	10^8	обнаружен	обнаружен
9.	<i>B.anthraxis</i> 369	10^8	обнаружен	обнаружен
10.	<i>B.anthraxis</i> 55-ВНИИВВиМ	10^8	не обнаружен	не обнаружен
		10^9	обнаружен	обнаружен
11.	<i>B.anthraxis</i> M71	10^8	не обнаружен	не обнаружен
		10^9	обнаружен	обнаружен
12.	<i>B.anthraxis</i> Δ Ames 4	10^8	не обнаружен	не обнаружен
13.	<i>B.anthraxis</i> СТИ-1 МО	10^8	обнаружен*	обнаружен*
14.	<i>B.anthraxis</i> Ихтиман	10^8	обнаружен*	не обнаружен
15.	<i>B.anthraxis</i> Sterne	10^8	не обнаружен	не обнаружен
16.	<i>B.cereus</i> 96	10^8	не обнаружен	не обнаружен
17.	<i>B.polymyxa</i> 313/04	10^8	обнаружен*	обнаружен*

Примечание: «обнаружен*» - слабо прокрашенная полоса розового цвета.

Испытание ИХ-тестов с целью оценки их пригодности для индикации и идентификации сибиреязвенного микроба позволило установить их низкую эффективность в выявлении спорового антигена некоторых штаммов *B.anthraxis* и наличие перекрестных реакций с близкородственными сапрофитами. Заявленная разработчиками возможность прямого применения ИХ-тестов для обнаружения *B.anthraxis* в объектах внешней среды «...после специальной пробоподготовки» является сомнительной по тому же ряду причин, описанных выше. Тем не менее, несмотря на указанные недостатки, данные тест-системы могут быть использованы в качестве предварительных скрининговых методов при санитарной оценке объектов внешней среды, подозреваемых в высокой степени обсеменения спорами возбудителя сибирской язвы, например, мест прирезки скота или его падежа, выгульных площадок.

ВЫВОДЫ

1. Из всех разработанных в последние десятилетия элективных и селективных дифференциально-диагностических питательных сред (СДДПС) наиболее перспективными для включения в алгоритм комплексного исследования объектов внешней среды, подозреваемых в контаминации возбудителем сибирской язвы, являются СДДПС, основанные на выявлении признака фосфатазной активности.

2. Иммунохроматографические тесты («ИХ-тест *B.anthraxis*», «Тест-полоска *B.anthraxis*»), эритроцитарный сибиреязвенный иммуноглобулиновый диагностикум и применение фага R/D-Ph-6 в реакции нарастания титра фага имеют низкую

диагностическую эффективность при прямом обнаружении спор сибиреязвенного микроба в объектах внешней среды, а необходимость использования выявляемого патогена в концентрациях 10^6 - 10^8 и более спор/см³ делает ограниченным их прямое применение для санитарной оценки объектов внешней среды, контаминированных спорами *B.anthraxis*.

3. Новый фаг R/D-Ph-6 имеет более широкий спектр литической активности, чем Fаh-ВНИИВВиМ и не отличается от последнего по специфичности. Особенностью данного фага является его способность лизировать культуры фагорезистентных к Fаh-ВНИИВВиМ штаммов сибиреязвенного микроба.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный комплекс исследований по оценке эффективности и пригодности современных методов экспресс-индикации и идентификации возбудителя сибирской язвы в объектах внешней среды позволил установить, что некоторые из новых разработок не имеют практической значимости при проведении лабораторных диагностических исследований в силу их низкой чувствительности, воспроизводимости, информативности, а также высоких трудовых и материальных затрат, однако могут быть использованы в практике научно-исследовательских институтов при анализе коллекций сибиреязвенного микроба. В схеме лабораторных исследований целесообразно использование новых селективных дифференциально-диагностических питательных сред, основанных на выявлении признака фосфатазной активности, и фаг R/D-Ph-6.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Алгоритм лабораторной диагностики при исследовании иксодовых клещей на туляремию из природного очага /А.А. Зайцев [и др.] //Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных: материалы Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием. – Ставрополь: ООО «Экспо-Медиа», 2012. - С. 124 – 125.
2. Апробация применения бактериофага «R/D-Ph-6» в тесте нарастания титра для идентификации *Bacillus anthracis* /О.И. Цыганкова [и др.] //Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных: материалы Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием. – Ставрополь: ООО «Экспо-Медиа», 2012. - С. 147 – 148.
3. Атипичные штаммы возбудителя сибирской язвы /Е.И. Еременко [и др.] // Современные аспекты профилактики зоонозных инфекций: тез. докл. научной конференции. - Ставрополь, 1991. – С. 78-80.
4. Бакулов, И.А. Сибирская язва / И.А. Бакулов, В.А. Гаврилов, В.В. Селиверстов - Владимир, 2001. – 285 с.
5. Головинская, Т.М. Сравнительная характеристика литической активности сибиреязвенных бактериофагов по отношению к фагорезистентным вариантам культур *Bacillus anthracis* /Т.М. Головинская, О.И. Цыганкова //Современные технологии в совершенствовании мер предупреждения и ответных действий на чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения санитарно-эпидемиологического характера: материалы XI Межгос. науч.-практ. конф. – Саратов, 2012. – С. 66-68.
6. Егорова, И.Ю. Фенотипические и генетические маркеры полевых изолятов *B. anthracis*: дис. канд. вет. наук: 16.00.03 /Егорова Ирина Юрьевна. – Покров, 2004. – 137 с.
7. Егорова И.Ю. Селянинов Ю.О. Панель микроорганизмов рода *Bacillus* для оценки специфичности тест-систем и аккредитации лабораторий. Материалы III Ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням. 28-30 марта 2011 г. Москва. 2011. – С. 117.
8. Еременко, Е.И. Биологические и популяционные аспекты патогенности *Bacillus anthracis*: дис. ... док. мед. наук. – Ставрополь, 1997.- 275 с.

9. Изучение биологических свойств бактериофага ВЛАЗ диагностического сибиреязвенного жидкого /Р.Г. Трошев [и др.] //Актуальные проблемы биологической защиты войск и населения, диагностика, лечение и профилактика опасных инфекционных заболеваний. Эпидемиология и эпизоотология. Микробиология. Биотехнология. Экология: материалы Всерос. науч.-практ. конф. – Екатеринбург, 2009. – С. 139-140.
10. Изучение штаммов возбудителя сибирской язвы, выделенных на территории России и других стран /И.А. Бакулов, В.А. Гаврилов, Н.С. Косяченко, Ю.В. Числов //Доклады Россельхозакадемии. – 1997. - № 2. – С. 40-42.
11. Калдыркаев, А.И. Исследование специфичности сибиреязвенного бактериофага /А.И. Калдыркаев, А.И. Феоктистова, Г.Ф. Архипова //Материалы Междунар. науч.-практ. конф. - Ульяновск, УГСХА, 2009. - С. 160-161.
12. Микробиологическая диагностика сибирской язвы /Л.И. Маринин [и др.]. – М., 1999. – С.104-105.
13. Пат. RU 2125610 С1, кл. 6 С12 Q1/02. Плотная питательная среда для выявления возбудителя сибирской язвы / В.А. Говорунова, Г.В. Мацаренко, Л.И. Маринин, А.В. Степанов. -1999. – 2 с.
14. Проблемы современной фагодиагностики сибирской язвы: перспективы решения /Л.М. Дербина [и др.] //Актуальные проблемы биологической защиты войск и населения, диагностика, лечение и профилактика опасных инфекционных заболеваний. Эпидемиология и эпизоотология. Микробиология. Биотехнология. Экология: материалы Всерос. науч.-практ. конф. – Екатеринбург, 2009. – С. 140-142.
15. Разработка селективной дифференциально-диагностической среды для выделения возбудителя сибирской язвы и близкородственных бацилл группы *Bacillus cereus* /А.Г. Рязанова [и др.] //Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных: материалы Всерос. науч.-практ. конф. с Междунар. участием. – Ставрополь: ООО «Экспо-Медиа», 2012. - С. 179 – 180.
16. Разработка иммунохроматографической тест-системы на основе высокоспецифичной пары антител для обнаружения спор *Bacillus anthracis* /Е.В. Баранова [и др.] //Международные медико-санитарные правила и реализация глобальной стратегии борьбы с инфекционными болезнями в государствах-участниках СНГ: материалы VIII Межгос. науч.-практ. конф. государств-участников СНГ. – Саратов, 2007. – С. 292-293.
17. Сибирская язва: актуальные аспекты микробиологии, эпидемиологии, клиники, диагностики, лечения и профилактики /Г.Г. Онищенко [и др.] - М., 1999 г. – 448 с.
18. Средства обеззараживания сибиреязвенных почвенных очагов /И.А. Дятлов [и др.] //Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных: материалы Всерос. науч.-практ. конф. с Междунар. участием. – Ставрополь: ООО «Экспо-Медиа», 2012. - С. 35 – 36.
19. Степанюк, О. П. Некоторые особенности распределения спорообразующей микрофлоры в почве мест захоронения трупов животных, павших от сибирской язвы /О.П. Степанюк, А.И. Завирюха, Б.Л. Троценко //Достижения и перспективы борьбы с сибирской язвой в СССР.: тез. докл. X пленарного заседания межведомственной научно-методической комиссии по борьбе с сибирской язвой г. Баку 28-29 сентября 1978 г. - М., 1978. - С. 147-168.
20. Характеристика новых препаратов для диагностики сибирской язвы по данным медицинских испытаний /Л.В. Саяпина [и др.] //Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных: материалы Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием. – Ставрополь: ООО «Экспо-Медиа», 2012. - С. 181.