



ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ

УДК: 619:576.809.7.852

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2022.2.10

ПОЛУЧЕНИЕ ИЗОЛЯТА СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ, ЕГО РЕГИСТРАЦИЯ И ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ В СООТВЕТСТВИИ С ТРЕБОВАНИЯМИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ

Е.А. Артемьева – к. вет. н., зав. лабораторией, Л.А. Мельникова – к. вет. н.,
вед.науч.сотр., А.П. Родионов* - млад. науч. Сотр., Н.И. Хаммадов – к. биол. н.,
вед.науч.сотр.

ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности»

Ключевые слова: сибирская язва, изолят, штамм, биологические свойства, биологическая безопасность. **Key words:** anthrax, isolate, strain, biological properties, biological safety



РЕФЕРАТ

Государственные коллекции патогенных микроорганизмов играют важную роль в обеспечении биологической безопасности Российской Федерации. Они осуществляют хранение и комплексное изучение коллекционных штаммов микроорганизмов с помощью современных методов. Формирование коллекционного фонда происходит за счет депонирования и поступления штаммов по запросу из других коллекций, а также выделенных при проведении индикации, диагностических и мониторинговых исследованиях природных экосистем, и в ходе экспериментальной деятельности. Целью данной работы было изучить биологические свойства полученного в установленном порядке изолята возбудителя сибирской язвы, оформить на него паспорт и включить в перечень коллекционных штаммов для дальнейшего хранения. В работе использовали изолят возбудителя сибирской язвы, выделенный при диагностических исследованиях от свиней в г. Сенгилей Ульяновской области. Полученные результаты исследования показали, что биологические свойства изолята идентичны вирулентному штамму Ч-7 возбудителя сибирской язвы. В результате чего, выделенный изолят отнесен к роду *Bacillus*, виду *anthracis* и обозначен, как штамм «Сенгилей», с внесением этих данных в необходимые журналы. Проведенная работа по изучению биологических свойств изолята сибирской язвы показала строгое поэтапное соблюдение требований биологической безопасности с оформлением всех необходимых документов в соответствии с нормативно-правовыми требованиями.

ВВЕДЕНИЕ

Коллекция патогенных микроорганизмов играет важную роль в обеспечении санитарно-эпидемиологического и санитарно-эпизоотологического благополучия

Российской Федерации. Детальное изучение свойств патогенов, сохранение их в неизменном виде необходимо при мониторинге территорий в случае природно-очаговых инфекций, расследования путей

их завоза и недопущения дальнейшего распространения возбудителя; а также при разработке комплекса профилактических мероприятий, направленных против опасных инфекционных болезней человека и животных [7, 8].

По данным Международного эпизоотического бюро, по всему миру наблюдается рост выявления новых неизученных, а также уже известных инфекционных заболеваний. В результате международного сотрудничества в сфере торговли и обмена животными и их сырьем, а также стремительного развития туризма увеличивается риск заноса возбудителей инфекционных болезней из других территорий [1]. Так, одним из особо опасных инфекционных заболеваний является сибирская язва, представляющая серьезную проблему для сельского хозяйства и системы здравоохранения в целом [9]. Возбудитель сибирской язвы уникален своей способностью при попадании в неблагоприятные условия существования, образовывать споры, которые могут сохранять свою жизнеспособность более 100 лет, создавая тем самым угрозу заражения людей и животных [2, 6]. Для недопущения этого как в России, так и за рубежом разрабатываются текущие, плановые, мониторинговые и профилактические мероприятия, осуществление которых диктует необходимость разработки и создания новых высокоэффективных биопрепаратов [4, 5]. Одной из первостепенных задач выпуска качественных профилактических средств и диагностических препаратов является тщательное изучение стабильности производственных штаммов микроорганизмов и всех присущих им генетических свойств [3].

За последние годы научными учреждениями страны предложен и внедрен в производство ряд биопрепаратов для борьбы с инфекционными болезнями. Их выпуск осуществляется на основе производственных штаммов, которые биопредприятия получают из Государственных коллекций в установленном порядке согласно СП 1.3.3118-13 и СП, СП 1.2-036-95 и СП 1.2_17. Главной целью послед-

них является создание оптимальных условий хранения, исключающих морфологические изменения штаммов, изменение их биологических, серологических, токсических свойств и чувствительности к антибиотикам. [3, 8]. Формирование коллекционного фонда происходит за счет депонирования и поступления штаммов по запросу из других коллекций, а также выделенных при проведении индикации, диагностических и мониторинговых исследованиях природных экосистем, и в ходе экспериментальной деятельности согласно СП 1.3.3118-13 и СП, СП 1.2-036-95 и СП 1.2_17 [8].

Целью данной работы было изучить биологические свойства полученного в установленном порядке изолята возбудителя сибирской язвы, оформить на него паспорт и включить в перечень коллекционных штаммов для дальнейшего хранения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использовали изолят возбудителя сибирской язвы, выделенный при диагностических исследованиях от свиней в г. Сэнгилай Ульяновской области. Работу выполняли по «Программе по изучению биологических свойств изолята сибирской язвы», утвержденной зам. директора по научно-исследовательской работе ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ».

Исследование проводили с постановкой контроля: положительного - вирулентный штамм Ч-7 *B. anthracis* и отрицательного - *B. cereus*. Культуральные свойства изолята сибирской язвы и контролей проверяли посевом на мясопептонный агар (МПА), мясопептонный бульон (МПБ) и бульон Хоттингера; тинкториально-морфологические свойства изучали микроскопией мазков, окрашенных по Граму и Леффлеру; подвижность - в висячей капле; протеолитические свойства - уколом в 12 %-ый желатин и обезжиренное молоко; гемолитическую активность определяли посевом изолята на 5 %-ный кровяной агар; феномен «ожерелья» - по модификационной схеме в бульоне Хоттингера с 20 % инактивированной лошадиной сыворотки и 0,5 ЕД

Таблица 1

Олигонуклеотиды, применяемые для амплификации генетического материала возбудителя сибирской язвы

Название	Нуклеотидная последовательность 5' -> 3'	ID ДНК-маркера
B anthracis F	AATCGATGAGCTAATGAACAATGACCCT	CP047131.1
B anthracis R	GGCACATGGTACTACTCAAACAAGATTCA	
pXO1 F	TCTAGAATTAGTTGCTTCATAATGGCTG	M30210.1
pXO1 R	CAATTTATTAACGATCAGAT- TAAGTTCATTATT	
pXO2 F	TCATCCTCTTTTAAGTCTTGGGTTATATT	FR872886.1
pXO2 R	TGTGATGAACTCCGACGACAAA	

пенициллина на 1 мл бульона; чувствительность к специфическим фагам - путем нанесения на поверхность 24 часовой культуры бактериофагов К-ВИЭВ и Fah-VНИИВВиМ; капсулообразование – на среде государственного контрольного института (ГКИ).

Для выявления капсулообразования *in vivo* (ускоренная биологическая проба) - заражали 12 белых мышей в дозе 0,2 мл внутрибрюшинно. Вирулентность определяли на 12 морских свинках, которым вводили суспензию изолята сибирской язвы и контролей подкожно в дозе 0,5 мл в область живота.

Принадлежность изолята к сибирской язве определяли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) при температуре отжига 600С с постановкой контролей, используя в этом качестве олигонуклеотиды, комплементарные по своей последовательности нуклеотидов к специфическим локусам В anthracis: «CDS_1868», локализованный в хромосомальной ДНК; «lef», кодирующий летальный фактор, расположенный в плазмиде «pXO1»; «pXO2-AT», расположенный в плазмиде «pXO2». Нуклеотидные последовательности используемых праймеров представлены в таблице 1.

Выделение нуклеиновых кислот производили методом магнитной сорбции с комплектом реагентов «МАГНО-сорб» вариант 100-200 («АмплиСенс» ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) согласно инструкции производителя. Для ПЦР амплификации (для амплификации каждого генетического маркера,

отдельно) использовали следующий состав реакционной смеси из расчета на одну пробу: 1.5 мкл 25 mM раствора MgCl₂; 1.5 мкл 2.5 mM раствора dNTP; 1.5 мкл 10x буфера для ПЦР, содержащего краситель «EvaGreen»; 10 pM раствора прямого и обратного праймеров по 0.5 мкл; 0.5 мкл Taq-полимеразы; 5 мкл ДНК и 3.5 деионизированной воды. Для ПЦР использовались реактивы производства ЗАО «Синтол» (Москва, Россия). Конечный объем реакционной смеси составил 15 мкл.

ПЦР осуществляли на амплификаторе С1000 с оптическим блоком CFX96 (BioRad). Программа для амплификации была следующей: (I) денатурация ДНК при 95 °С в течение 2 минут; (II) 40 циклов, состоящих из: 10 секунд при 95 °С, 30 секунд при 60 °С. Детекция результата ПЦР (флуоресценции) происходит на каждом из 40 циклов второй стадии ПЦР, при 60 °С по каналу FAM.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изолят был доставлен нарочным в лабораторию коллекции штаммов микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (Казань, Россия) и передан по Акту с сопроводительным письмом с внесением в «Журнал регистрации патогенных биологических агентов, поступающих для исследования (идентификации) и хранения» - Форма учета № 512/у. Обследование целостности упаковки и содержимого контейнера показало, что они не нарушены. По результатам его вскрытия был составлен «Акт вскрытия», который вместе с письмом, подтверждающим по-

Таблица 2

Результаты изучения биологических свойств культуры изолята *B. anthracis* и контролей

Дифференциальный признак	Исследуемый изолят культуры	Эталонный штамм Ч-7	<i>B. cereus</i> (сапрофит)
Форма и положение клеток под микроскопом	Длинные палочки, цепи из обрубленных палочек	Длинные палочки, цепи из обрубленных палочек	Палочка, цепочка
Подвижность	-	-	+
Капсулообразование	+	+	-
Спорообразование	+	+	+
Окраска по Граму	+	+	+
Рост на бульоне	Бульон прозрачный, на дне рост в виде комка ваты	Бульон прозрачный, на дне рост в виде комка ваты	В виде мути, на поверхности пленка
Колонии на агаре	Сухие, морщинистые, переплетающиеся отростки в виде гривы	Сухие, морщинистые, переплетающиеся отростки в виде гривы	Воскоподобные, не прозрачные
Рост на желатине	В виде перевернутой елочка	В виде перевернутой елочка	В виде чулка
Гемолиз (на кровяном агаре)	-	-	+
Чувствительность к пенициллину (феномер «Ожерелья»)	+	+	-
Чувствительность к сибирязвенному фагу (К-ВИЭВ и Fah-VНИИВВиМ)	+	+	-
Патогенность	Белые мыши, морские свинки, кролики	Белые мыши, морские свинки, кролики	Белые мыши
ПЦР	+	+	-

лучение изолята, направили в Управление ветеринарии Ульяновской области.

Использование изолята в опыте фиксировали в «Журнале учета ПБА, находящегося в рабочей коллекции» - Форма учета № 518/у и в «Журнале учета движения ПБА (посевы) - Форма учета № 514/у-1.

В ходе исследования нами было установлено, что при посеве изолята на МПА через сутки появляются тусклые с матовой поверхностью неправильной формы затемненным центром локонообразными отростками колонии; на МПБ рост в виде рыхлого осадка с легким помутнением

без пристеночного кольца. В мазках суточной культуры окрашенных по Граму наблюдали грамположительные палочки с прямыми обрубленными концами, расположенными в виде длинных цепочек. В висячей капле культура не подвижна.

В среде ГКИ, через 16 часов после инкубации, у микроба обнаружена капсула. Способность изолята к капсулообразованию была выявлена и *in vivo* ускоренной пробой на белых мышах.

При посеве на кровяной агар в чашках Петри через 24 часа при температуре 37 °С зона гемолиза не обнаружена. Тест

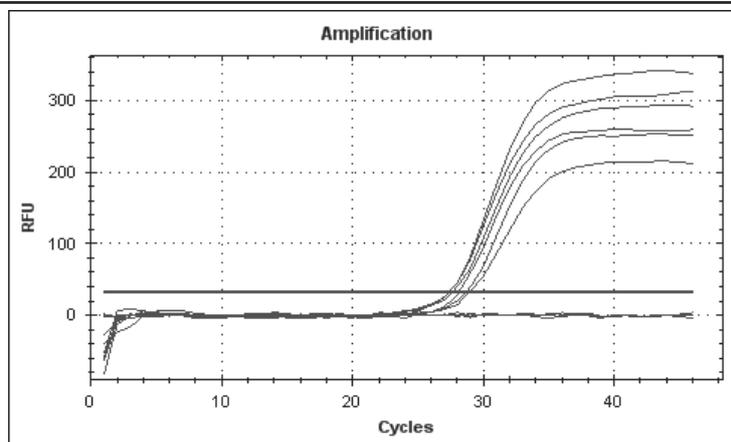


Рис. Амплификация генетического материала исследуемого образца, эталонного штамма *Bacillus anthracis* Ч-7 и *Bacillus cereus*.

«жемчужного ожерелья» показал характерный признак для возбудителя сибирской язвы: в мазках палочки располагаются в виде цепочек, шарообразной формы, напоминающие «ожерелье из жемчуга» или «бусы».

Для изучения вирулентности и капсулообразования был оформлен приказ «О проведении опыта по заражению животных изолятом, вирулентным штаммом Ч-7 *B. anthracis* и *B. cereus*» за подписью директора, составлен акт обследования бокса о его готовности для содержания подопытных животных, и схема проведения опыта и календарный план, подписанные заместителем директора по НИР. Введение культур изолята сибирской язвы животным положительного и отрицательного контроля регистрировали в «Журнале учета ПБА (животные) - Форма учета № 514/у-3».

Проведенные нами исследования показали следующее: 1) культура вирулентна - морские свинки пали на 4-6 сутки после заражения; 2) чувствительна к бактериофагам К-ВИЭВ и Fah-ВНИИВВиМ - в зоне нанесения бактериофага осталась стерильная полоса при наличии роста культуры на остальных участках среды. Учет выделенных культур при бактериологическом исследовании отмечали в «Журнале учета выделенных штаммов микроорганизмов» - Учетная форма № 513/у.

Результаты, полученные при исследовании изолята сибирской язвы с постановкой контролей представлены в таблице 2. Как видно из таблицы, полученные результаты исследования биологических свойств изолята идентичны вирулентному штамму Ч-7 возбудителя сибирской язвы.

Проведенная ПЦР амплификация анализируемых образцов показала полное совпадение (амплификация всех трёх генетических маркеров) у исследуемого образца с эталонной ДНК возбудителя сибирской язвы. Амплификация генетического материала *Bacillus cereus* была отрицательной по всем трём локусам. Результаты амплификации анализируемых образцов представлены на рисунке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вся работа по изучению биологических свойств изолята сибирской язвы проводилась в соответствии со строгим поэтапным соблюдением требований биологической безопасности и оформлением всех необходимых документов в соответствии с СП 1.3.3118-13 и СП 1.2.-036-95 и СП 1.2._17.

В результате проведенных исследований установлено, что выделенный изолят соответствует капсулообразующему штамму возбудителя сибирской язвы, отнесен к роду *Bacillus*, виду *anthracis*, обозначен как штамм «Сенгилай» и внесён в соответствующую графу

«Инвентарного журнала коллекционных ПБА» Учетная форма № 515/у и «Карту индивидуального учета коллекционного ПБА» Учетная форма № 517/у. Составлен «Акт комиссионной проверки изучения биологических свойств изолята сибирской язвы» и на основании его данных оформили паспорт на штамм.

Полученные нами результаты свидетельствуют о возможности пополнения коллекционного фонда изолятами, выделенными при диагностических и других исследованиях, которые могут быть использованы в перспективе в качестве штаммов-кандидатов для разработки средств диагностики и специфической профилактики.

PRODUCTION OF ANTHRAX ISOLATE, ITS REGISTRATION AND STUDY OF BIOLOGICAL PROPERTIES IN ACCORDANCE WITH BIOLOGICAL SAFETY REQUIREMENTS.
E.A. Artemeva – PhD of vet. sciences, head of laboratory L.A. Melnikova – PhD of vet. sciences, leading researcher, A.P. Rodionov* - junior researcher, N.I. Hammatov – PhD of biol. sciences, leading researcher (Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety)

ABSTRACT

State collections of pathogenic microorganisms play an important role in ensuring the biological safety of Russian Federation. They carry out storage and comprehensive study of collection strains of microorganisms using modern methods. The collection fund is formed due to the deposition and receipt of strains upon request from other collections, also those isolated during the indication, diagnostic and monitoring studies of natural ecosystems, and in the course of experimental activities. The purpose of this work was to study the biological properties of the anthrax pathogen isolate obtained in the established manner, issue a passport for it and include it in the list of collection strains for further storage. An isolate of anthrax pathogen isolated during diagnostic studies from pigs in the city of Sengiley, Ulyanovsk region. The results of the study showed that the biological properties of the isolate are identical to the virulent strain “Ch

-7” of the anthrax pathogen. As a result, the isolate was assigned to the genus *Bacillus*, species *anthracis* and designated as the strain “Sengiley”, with the introduction of these data necessary journals. The work carried out to study the biological properties of anthrax isolate showed a strict compliance with biological safety requirements with the execution of all necessary documents in accordance with regulatory documents.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Андреева, Д.В. Сравнительная эффективность серологических тестов для диагностики сапа. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук. М., 2003. – С. 3-17.
2. Артемьева, Е.А. Испытание «Набора определения титра антител в сыворотке крупного рогатого скота вакцинированного против сибирской язвы в РНГА» на соответствие техническим условиям / Е.А. Артемьева, Л.А. Мельникова, А.П. Родионов // Ветеринарный врач. – 2020. - №6. – С. 5-11.
3. Ветеринарные препараты. Ю.Ф. Борисович, Л.В. Кирилов; под ред. Д.Ф. Осидзе. - М.: Колос, 1981. - 447 с.
4. Иванова, С.В. Применение эритроцитарного диагностикума для оценки эффективности иммунопрофилактики сибирской язвы у крупного рогатого скота / С.В. Иванова, Л.А. Мельникова, А.П. Родионов и др. // Ветеринария. – 2019. - №6. – С. 25-28.
5. Иванова, С.В. Получение эритроцитарного сибирезвенного антигена / С.В. Иванова, Л.А. Мельникова, Х.Н. Макаев и др. // Ветеринарный врач. – 2019. - №2. – С. 22-25.
6. Иванова, С.В. Мониторинг факторов потенциальной опасности возникновения вспышек сибирской язвы / С.В. Иванова, А.П. Родионов, Л.А. Мельникова // Иппология и ветеринария. – 2021. – №1. – С. 93-100.
7. Онищенко, Г.Г. Коллекционная деятельность в области использования патогенных микроорганизмов в обеспечении биологической безопасности Российской Федерации / Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырев, А.В. Осин // Инфекционные болезни:

новости, мнения, обучение. – 2016. - №1. – С. 37-43.

8.Онищенко, Г.Г. Современное состояние коллекционной деятельности связанной с использованием возбудителей инфекционных болезней I-II патогенности / Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырев, А.В. Топорков

и др. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2010. - №1. – С. 5-10.

9.Родионов, А.П. Эпизоотическая характеристика стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов в Республике Татарстан / А.П. Родионов, Е.А. Артемьева, Л.А. Мельникова и др. // Ветеринарный врач. – 2021. - №1. –С.50-55.

УДК: 619:616-097:57.088.1

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2022.2.16

ПРИМЕНЕНИЕ КОНЬЮГАТА НА ОСНОВЕ КОЛЛОИДНОГО ЗОЛОТА ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ БЕШЕНСТВА В ДОТ-ИММУНОАНАЛИЗЕ

Ахмадеев Р. М.1 – ведущий научный сотрудник (0000-0002-1732-6977), Галеева А. Г.1 – старший научный сотрудник (0000-0003-2650-6459), Арсланова А. Ф.1 – старший научный сотрудник, Ефимова М. А.1,3 – ведущий научный сотрудник (0000-0001-8786-1310), Насыров Ш. М.1 – ведущий научный сотрудник, Кашеваров Г. С.1 – старший научный сотрудник, Яруллин А. И.1 – старший научный сотрудник, Сальников В. В.2 – заведующий лабораторией (0000-0002-2367-672X) 1 – ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»), г. Казань; 2 – Казанский институт биохимии и биофизики (КИББ) ФИЦ КазНЦ РАН, г. Казань; 3 – ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н. Э. Баумана», г. Казань

Ключевые слова: бешенство, дот-иммуноанализ, иммуноферментный анализ, коллоидное золото. **Key words:** rabies, dot immunoassay, ELISA, colloidal gold



РЕФЕРАТ

Целью исследований явилась разработка прямого дот-иммуноанализа на нитроцеллюлозной мембране (НЦМ) с использованием конъюгата на основе коллоидного золота для качественного определения наличия антигена вируса бешенства в патологическом материале. В качестве исследуемых образцов использовали пробы головного мозга (ГМ) разных видов животных, явившиеся положительными при первичном исследовании методами флуоресцирующих антител: лисиц и мышей. РИФ и непрямой «сэндвич»-ИФА (иммуноферментный анализ) проводили с использованием диагностических наборов изготовленных в ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ». В материалах представлены результаты первичных лабораторных испытаний тест-системы для индикации рабического антигена на основе прямого дот-иммуноанализа (ДИА) 81 образца патологического материала, головного мозга разных видов животных. Показано, что ДИА обладает 100% специфичностью, а его оптические сигналы коррелируют с результатами непрямого ИФА. Предложенный метод ДИА, помимо самостоятельного применения, может также послужить базисом для конструирования тест-систем на основе иммунохимического анализа (ИХА).