

данные по биоразнообразию вибрионов, их генетике, эпидемиологии, экологии и различным прикладным аспектам, а также наметить дальнейшие наиболее перспективные направления исследований. Была отмечена высокая пластичность геномов *Vibrio* и высокая скорость адаптации вибрионов к условиям внешней среды. Исследования вибрионов с применением современных молекулярно-биологических и компьютерных технологий обеспечат в дальнейшем лучшее понимание особенностей биологии этой большой и важной группы морских бактерий.

Работа поддержана грантом РФФИ № 05-04-48727.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bartlett D. // Materials of second conference on the biology of vibrios «Vibrio 2007» Paris, 28 Nov. – 1 Dec. 2007, Absr. Book, Institut Pasteur, Centre d'Information Scientific. – Paris, 2007. – P. 6. – 2. Cervino J.M., Lorence E.A., Thompson F.L. *et al.* // Там же. – P. 34. – 3. Dziejman M., Serutto D., Tam V.S. *et al.* // PNAS. – 2005. – Vol. 102, N 9. – P. 3465–3470. – 4. Gonzalez-Escalona N., Martinez-Urtaza J., Romero J. *et al.* // Materials of second conference on the biology of vibrios «Vibrio 2007» Paris, 28 Nov. – 1 Dec. 2007, Absr. Book, Institut Pasteur, Centre d'Information Scientific. – Paris, 2007. – P. 7. – 5. Hammer B.K., Bassier B.L. // Там же. – P. 14. –

6. Hjerde E., Lorentzen M.S., Holden M.T.G. *et al.* // Там же. – P. 13. – 7. Iida T. // Там же. – P. 10. – 8. Kashi Y. // Там же. – P. 8. – 9. Kim Y.R., Lee S.E., Kook H.E. *et al.* // Там же. – P. 29. – 10. Mazel D. // Там же. – P. 17. – 11. Nair G.B., Bhuiyam N.A., Nusrin S. *et al.* // Там же. – P. 26. – 12. Nakhamchik A., Wilde K., Rowe-Magnus D.A. // Там же. – P. 20. – 13. Oliver J.O., Bogard R., Warner E. *et al.* // Там же. – P. 30. – 14. Rosenberg E., Zilber-Rosenberg I. // Там же. – P. 32. – 15. Saeed A., Abd H., Edvinsson B. *et al.* // Там же. – P. 22. – 16. Thompson F.L., Sawabe T., Thompson C.C. *et al.* // Там же. – P. 4. – 17. Ussery D.W. // Там же. – P. 3. – 18. Val M.-E., Barre F.-X. // Там же. – P. 12. – 19. Yamaichi Y., Fogel M.A., Waldor M.K. // Там же. – P. 11.

G. A. Yeroshenko

#### Main Trends of the Up-to-Date Research of Cholera Vibrios Biology

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov

The review presents the data covered during the Second International Conference on the Biology of Vibrios "Vibrio 2007" (Paris, from November, 28<sup>th</sup> to December, 1<sup>st</sup>, 2007). Set forth are main trends of state-of-the-art vibrios research concerning their biodiversity, the peculiarities of genome arrangement, pathogenicity, epidemiology and ecology.

**Key words:** Vibrios, biodiversity, genome arrangement, pathogenicity, epidemiology, ecology.

Поступила 26.02.08.

УДК 616.981.452+576.858:616-097

Т.А.Малюкова, Т.А.Костюкова, Е.М.Головко, М.Н.Ляпин, С.А.Щербакова, Е.А.Плотникова, Е.В.Найденова

#### ПОДГОТОВКА МАТЕРИАЛА, ОТОБРАННОГО В СОПРЯЖЕННЫХ ОЧАГАХ ЧУМЫ И АРБОВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ, К ПРОВЕДЕНИЮ ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ. Сообщение 2

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Представлены результаты второго этапа исследований по использованию  $\beta$ -пропиолактона для обеззараживания возбудителя чумы. Показано, что препарат в концентрации 0,1 % при экспозиции 18–24 ч в условиях холодильника, а также не менее 6 ч при температуре 37 °С обеззараживает *Yersinia pestis* 231 как во взвесях, так и в суспензиях из внутренних органов. Предложены оптимальные режимы подготовки материала, отобранного в сопряженных очагах чумы и арбовирусных инфекций, к проведению иммунологического исследования.

**Ключевые слова:** *Yersinia pestis*, арбовирусы, обеззараживание,  $\beta$ -пропиолактон, ИФА.

При проведении иммунологических исследований материал подвергают предварительной обработке с целью обеззараживания. При подозрении на наличие возбудителя чумы используют формалин [1], для инактивации арбовирусов –  $\beta$ -пропиолактон (БПЛ) [2]. Отсутствие регламентированных способов инактивации образцов, одновременно содержащих чумной микроб и арбовирусы, и наличие реальных сопряженных природных очагов данных инфекций определяют актуальность поиска единого способа обеззараживания.

Полученные в ходе первого этапа исследований [3] положительные результаты обеззараживания взвесей из культур вакцинного штамма чумного

микроба с помощью 0,1 % БПЛ (конечная концентрация в пробе) при температуре 4 °С и экспозиции 6 ч позволили сделать предположение о возможности использования препарата для обработки взвесей вирулентных культур чумного микроба, а также суспензий из органов зараженных ими лабораторных животных.

Известно, что для инактивации инфекционной активности арбовирусов с помощью 0,05–0,1 % БПЛ (конечная концентрация в пробе) рекомендовано два режима: при 37 °С в течение 8–10 ч и при 4 °С в течение 96 ч [2]. Способ обработки в заданных режимах обеспечивает надежность инактивации и высокую чувствительность серологических реакций, прово-

димых с подготовленными пробами.

Цель настоящего исследования состояла в разработке оптимального режима обеззараживания  $\beta$ -пропиолактоном взвесей из культур вирулентного штамма чумного микроба и суспензий из органов лабораторных животных, павших от чумной инфекции, а также выяснение влияния его на эффективность диагностического исследования проб из сопряженных очагов чумы и арбовирусных инфекций (модельные эксперименты).

### Материалы и методы

Эксперименты проводили с использованием эталонного вирулентного штамма *Yersinia pestis* 231 из коллекции Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб». Штаммы культивировали на агаре LB при 28 и 37 °С. Из агаровых культур, выращенных при 37 °С в течение 2 сут, готовили взвеси концентрацией  $10^9$  м.к./мл. Для заражения лабораторных животных (белых мышей) использовали взвеси из культур штамма *Y. pestis* 231, выращенных при 28 °С в течение 2 сут. Биопробных животных заражали подкожно в дозе 500 м.к. в 0,2 мл 0,85 % NaCl, pH 7,2. После гибели животных вскрывали, внутренние органы (печень, селезенка, легкие, кровь) методом отпечатков высеивали на пластинки агара LB и использовали для приготовления суспензии в 0,85 % NaCl, pH 7,2. Жидкую фазу отбирали, разливали в равных количествах по пробиркам, довели объем до 5 мл с помощью 0,85 % NaCl, pH 7,2.

Пробы для модельного эксперимента содержали суспензии из внутренних органов биопробных животных, приготовленных описанным выше способом, и суспензии из клещей, собранных на территориях, эндемичных по Крымской-Конго геморрагической лихорадке (ККГЛ), в которых были выявлены специфические антигены. Для сравнения использовали аналогичные пробы, инаktivированные 2 % раствором формалина. Клещей от 1–5 до 10–20 (в зависимости от упитанности, вида, места сбора) помещали в стерильные ступки, растирали, заливали 0,85 % NaCl, pH 7,2. Отбирали жидкую фазу и добавляли в равных количествах к суспензиям из внутренних органов.

Взвеси и суспензии обрабатывали БПЛ, синтезированным ООО «Даймонд Тим» (Москва) и любезно предоставленным для проведения исследований.

В подготовленные пробы вносили цельный БПЛ до конечной концентрации в пробе 0,1 или 0,05 %, выдерживали 18 и 24 ч в условиях холодильника или 1, 3, 6, 8 и 24 ч в условиях термостата (37 °С). Контролем служили аналогичные суспензии и взвеси из культуры штамма *Y. pestis* 231, но без добавления БПЛ. Эффективность инаktivации оценивали в соответствии с действующими нормативно-методическими документами [4]. Образцы проверяли на специфическую стерильность посевами на плотные и жидкие питательные среды и заражением лабораторных животных. Эксперименты повторяли 3 раза.

Для постановки иммуноферментного анализа (ИФА) использовали тест-систему иммуноферментную моноклональную для идентификации капсульного антигена F1 чумного микроба (Ставрополь) и тест-систему для выявления антигенов вируса ККГЛ (ГУ НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН, Москва). Анализ проводили в соответствии с инструкциями по применению.

### Результаты и обсуждение

Первоначально изучали инаktivирующее действие БПЛ на взвеси из культуры штамма *Y. pestis* 231, выращенной при 37 °С. Предположили, что капсула, образующаяся у чумного микроба в подобных условиях, может препятствовать инаktivирующему действию БПЛ. В результате экспериментов установили, что после 1- и 3-часовой экспозиций с БПЛ рост чумного микроба на плотных и жидких питательных средах появлялся на 2-е сутки. После 6-, 8- и 18-часовой экспозиций получены специфически стерильные образцы (табл. 1). Следовательно, БПЛ полностью инаktivировал клетки *Y. pestis* 231. Для подтверждения полученных результатов и приближения условий лабораторных исследований к полевым были проведены эксперименты по инаktivации суспензий из внутренних органов белых мышей, зараженных *Y. pestis* 231. На плотных и в жидких питательных средах с посевами материала, прошедшего 3-часовую обработку 0,1 % БПЛ, через 2 сут отмечен специфический рост. Увеличение экспозиции до 6, 8 и 24 ч привело к гибели клеток чумного микроба в суспензиях, о чем свидетельствовало отсутствие специфического роста на питательных средах на

Таблица 1

Оценка эффективности инаktivации при 37 °С  $\beta$ -пропиолактоном взвесей *Y. pestis* 231 и суспензий органов белых мышей, зараженных *Y. pestis* 231

Экспозиция, ч	Концентрация БПЛ		
	0,1 %		0 %
	Посев на питательные среды	Посев внутренних органов биопроб	Посев на питательные среды
<b>Взвеси <i>Y. pestis</i> 231 (<math>10^9</math> м.к./мл)</b>			
1	2*		2*
3	3*		2*
6	Нет роста		2*
8	Нет роста		2*
18	Нет роста		2*
<b>Суспензии органов белых мышей, зараженных <i>Y. pestis</i> 231 (<math>10^5</math> м.к./мл)</b>			
3	2*	1*	2*
6	Нет роста	Нет роста	2*
8	Нет роста	Нет роста	2*
24	Нет роста	Нет роста	2*

\* Время (в сутках) появления роста на средах.

Таблица 2

Влияние способа обеззараживания материала на результаты ИФА							
Материал	Концентрация <i>Y. pestis</i> 231 (м.к./мл) в образцах						
	10 <sup>9</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>
<b>β-пропиолактон в конечной концентрации 0,1%</b>							
Взвеси из культуры <i>Y. pestis</i> 231	+	+	+	+	+	+/-	-
Пробы из внутренних органов грызунов, содержащие <i>Y. pestis</i> 231	+	+	+	+	+	+/-	-
Пробы в модельных экспериментах							
Результаты исследований с тест-системами для выявления							
F1 <i>Y. pestis</i>	+	+	+	+	+	+/-	-
антигенов ККГЛ	+	+	+	+	+	+	-
Отрицательный контроль (взвеси из <i>Y. pestis</i> 231, выращенные при 28 °С)	-	-	-	-	-	-	-
<b>2% р-р формалина</b>							
Взвеси из культуры <i>Y. pestis</i> 231	+	+	+	+	+	+/-	-
Пробы из внутренних органов грызунов, содержащие <i>Y. pestis</i> 231	+	+	+	+	+	+/-	-
Пробы в модельных экспериментах							
Результаты исследований с тест-системами для выявления							
F1 <i>Y. pestis</i> 231	+	+	+	+	+	+/-	-
антигенов ККГЛ	+	+	+	+	+	+	-
Отрицательный контроль (взвеси из <i>Y. pestis</i> 231, выращенные при 28 °С)	-	-	-	-	-	-	-

протяжении срока наблюдения. Оставались стерильными также пластины агара с отпечатками органов биопробных белых мышей, зараженных инактивированным материалом и забитых на 6-е сутки после заражения. Полученные результаты дают основание считать, что БПЛ в концентрации 0,1 % при температуре 37 °С и экспозиции не менее 6 ч вызывает гибель клеток чумного микроба в суспензиях из органов биопробных животных. Таким образом, режим инактивации материала, содержащего арбовирусы [2], оптимален для обеззараживания взвесей чумного микроба и суспензий из внутренних органов зараженных ими грызунов. Присутствие в пробе дополнительных компонентов (белков, липидов, липополисахаридов и др.) не снижает эффективности инактивации. Следовательно, данный режим может быть использован для обеззараживания проб из сопряженных очагов чумы и арбовирусных инфекций.

Существенным моментом выбора способа подготовки проб к проведению серологического исследования является сохранение чувствительности и специфичности иммунологических реакций. Для оценки влияния БПЛ на данные показатели проводили постановку ИФА с инактивированными БПЛ взвесями *Y. pestis* 231, суспензиями из внутренних органов биопробных животных, а также с пробами, одновременно содержащими суспензии из внутренних органов биопробных животных и клещей, в которых ранее были выявлены антигены вируса ККГЛ. Результаты постановки ИФА, отраженные в табл. 2, свидетельствуют о диагностической точности иммунологической реакции для обнаружения *Y. pestis* по наличию антигена FI и вируса ККГЛ по наличию специфических антигенов.

Следующим этапом стало изучение инактиви-

рующего действия БПЛ при пониженных температурах (в условиях холодильника) на взвеси *Y. pestis* 231 и суспензии из внутренних органов лабораторных животных, павших от чумы. Показано, что после обработки проб БПЛ в конечной концентрации 0,05 % в течение 18 ч рост чумного микроба отмечен на питательных средах на 2-е сутки, биопробные животные погибали на 4-е. При увеличении экспозиции до 24 ч получали обеззараженные образцы. Полной инактивации *Y. pestis* 231 добивались при обработке БПЛ в концентрации 0,1 % как в течение 18, так и 24 ч (табл. 3).

Таким образом, экспериментально подтверждено, что БПЛ в конечной концентрации 0,1 % при экспозиции 18–24 ч в условиях холодильника, а также экспозиции не менее 6 ч при температуре 37 °С обеззараживает *Y. pestis* 231 как во взвесях, так и в суспензиях из внутренних органов. Полученные результаты не выходят за рамки условий инактивации БПЛ арбовирусов. Модельные эксперименты показа-

Таблица 3

Оценка эффективности инактивации β-пропиолактоном в условиях холодильника суспензий из органов белых мышей, зараженных *Y. pestis* 231 (10<sup>6</sup> м.к./мл)

Экспозиция, ч	Концентрация БПЛ				
	0,1 %		0,05 %		0 %
	Посев на питательные среды	Посев внутренних органов биопроб	Посев на питательные среды	Посев внутренних органов биопроб	Посев на питательные среды
18	Нет роста	Нет роста	3*	4*	2*
24	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Нет роста	2*

\* Время (в сутках) появления роста на средах.



ли, что использование данного препарата не снижает качества иммунологических реакций для детекции чумного микроба и арбовирусов. Следовательно, применение БПЛ может быть рекомендовано как способ подготовки для иммунологических исследований проб из сопряженных очагов чумы и арбовирусных инфекций. При этом оптимальными режимами являются обеззараживание 0,1 % БПЛ (конечная концентрация в пробе по объему) в течение 8–10 ч при 37 °С и в течение 96 ч при 4 °С. Способ применим для проб малых объемов (микролитры). Можно предположить, что данный способ будет эффективен также в отношении субстратов гнезд птиц и млекопитающих, погадок хищных птиц, а также материала от больных людей, или лиц с подозрением на заболевание. Предварительная подготовка повышает уровень безопасности работы персонала с материалом, содержащим одновременно возбудителей чумы и арбовирусных инфекций, сохраняя ценность проб для лабораторной диагностики.

Представленные в статье результаты оформлены в виде заявки о выдаче патента на изобретение «Способ подготовки проб для серологических исследований из сопряженных очагов чумы и арбовирусных инфекций» № 2006128696 (приоритет 07.08.2006 г.).

УДК 616.981.51:616-097

Н.Е.Терешкина, З.Л.Девдариани

## СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ ИММУНОДЕТЕКЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

*Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов*

Авторами представлен анализ отечественной и зарубежной литературы последних лет, посвященной вопросам иммунодиагностики сибирской язвы. Дана краткая характеристика основных достижений в области разработки методов обнаружения *Bacillus anthracis* и его антигенов с помощью различных иммунодиагностических тестов. Обсуждаются наиболее важные проблемы, связанные с повышением эффективности современных иммунодиагностик и их внедрением в практику.

**Ключевые слова:** *Bacillus anthracis*, иммунодиагностика, поликлональные антитела, моноклональные антитела, иммунодиагностические препараты.

Сибирская язва – особо опасное инфекционное заболевание, поражающее животных и человека, этиологическим фактором которого является *Bacillus anthracis*. Особенности биологии сибиреязвенного микроба, обеспечивающие длительное сохранение его в почве с формированием стойких очагов, обуславливая высокий эпизоотический и эпидемический потенциал возбудителя, отсутствие типичных клинических проявлений при генерализованной (септической) форме болезни, а также высокая вероятность использования *B. anthracis* в качестве бактериологического оружия предопределяют актуальность исследований, направленных на совершенствование диагностики сибире-

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Безопасность работ с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности). Санитарные правила. СП 1.3.1285-03. // Бюлл. норм. и метод. док. Госсанэпиднадзора. – 2003. – № 3 (13). – С. 77–78. – 2. Выявление циркуляции арбовирусов. Методы вирусологических и серологических исследований, клинико-эпидемиологические характеристики малоизученных арбовирусных инфекций, подходы к мониторингу природных очагов арбовирусов: Метод. рекомендации // Итоги науки и техники. ВИНТИ. Сер. Вирусология. – 1991. – Т. 25. – С. 30–34. – 3. Малюкова Т.А., Головкин Е.М., Костиюкова Т.А. и др. // Пробл. особо опасных инф. – 2007. – Вып. 2 (94). – С. 64–66. – 4. Инструкция по контролю специфической стерильности экспериментальных препаратов, приготовленных из культур чумного или холерного микробов. – Саратов, 1982. – 8 с.

T.A.Maliukova, T.A.Kostiukova, E.M.Golovko, M.N.Lyapin,  
S.A.Shcherbakova, E.A.Plotnikova, E.V.Naidenova

### Preparation of the Materials, Sampled in Combined Foci of Plague and Arbovirus Infections, for Immunologic Assaying. Communication 2

*Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov*

The results of the second phase of the experiments are presented in the paper, where  $\beta$ -propiolactone was used to decontaminate materials from *Yersinia pestis*. Both slurries and suspensions of the internal organs were decontaminated of *Y. pestis* 231 with 0.1 % concentrations of the preparation after 18 to 24 hours' exposition in the refrigerator, as well as at 37 °C for as long as 6 hours or more. Optimal schedules for immunologic examination are offered to prepare the samples taken in the combined foci of plague and arboviral infections.

**Key words:** *Yersinia pestis*, arboviruses, decontamination,  $\beta$ -propiolactone, ELISA.

Поступила 30.11.06.

язвенной инфекции [9, 18, 19, 20, 22, 34].

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в этой области, создание новых быстрых и достоверных способов детекции сибиреязвенного микроба и его спор в объектах внешней среды и материале от больного остается приоритетной задачей. Бактериологическое исследование, оставаясь «золотым стандартом» диагностики любых бактериальных инфекций, в том числе сибирской язвы, требует значительных временных затрат (до трех суток) [8, 14, 16, 18, 19].

Практическое применение активно разрабатываемых в настоящее время генодиагностических