

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 иммунодиагностикомов 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-

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

## 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., Головки 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.Sherbakova, 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.

методов обнаружения *B. anthracis*, отличающихся быстротой получения результата, высокой чувствительностью и специфичностью, имеет ограничения, связанные с наличием в пробах из внешней среды примесей, ингибирующих полимеразную цепную реакцию (ПЦР), трудностью экстракции ДНК из спорных форм, а также необходимостью использования при постановке анализа дорогостоящих реактивов и оборудования [2, 16]. Поэтому особое внимание исследователей привлекает создание иммунодиагностикомов, которые, будучи относительно недорогими, наряду с высокой чувствительностью и специфичностью характеризуются экспрессностью, воспроизводимостью, простотой постановки и учета результатов [3, 10, 17]. Основным принципом иммунодетекции *B. anthracis*, заключающийся в визуальной или приборной регистрации реакции связывания микроорганизма или его антигенов со специфическими сибиреязвенными поли- и моноклональными иммунореагентами, реализуется при конструировании самых разнообразных иммунодиагностических тест-систем.

Одним из наиболее популярных методов выявления патогенных бактерий в нативном материале является люминесцентно-серологический или метод флуоресцирующих антител (МФА), основанный на обнаружении микроба при обработке специфическими антителами, мечеными флуорохромами. В нашей стране классический МФА относится к официально рекомендованным сигнальным методам обнаружения возбудителя сибирской язвы [14, 18, 19]. В последние годы предлагаются различные модификации данной методики. Так, эффективным в эксперименте оказался МФА с использованием меченных ФИТЦ антител кролика к соматическим антигенам сибиреязвенного микроба, предположительно содержащим диагностически значимые специфические белки S-слоя (фракции 1 и 3), полученным из культурального фильтрата *B. anthracis* СТИ [4, 11]. Применение экспериментальных иммунофлуоресцирующих диагностикумов, сконструированных на основе кроличьих антисывороток к соматическим белковым антигенам «С» (92 кДа) и «В» (30 кДа) *B. anthracis* СТИ-1 позволяет идентифицировать вегетативные формы возбудителя [5, 16]. Поскольку более активные в МФА антитела к белку «С» в рабочем титре взаимодействовали с *Bacillus cereus*, тогда как ФИТЦ-меченные иммуноглобулины к белку «В» обладали строгой специфичностью, но меньшей активностью, надежность этих диагностикумов обеспечивается только их сочетанным использованием. При помощи МКА к гамма-Д-глутаминовой кислоте, основному веществу капсулы *B. anthracis* [8, 34], методом прямой иммунофлуоресценции обнаруживали соответствующий антиген в сыворотке аэрозольно зараженных мышей, что совпадало с возникновением у них бактериемии [30].

Для идентификации спор сибиреязвенного микроба австралийские исследователи апробирова-

ли тест RAMP (rapid analyte measurement platform, англ.), основанный на детекции комплекса антиген-меченное флуорохромом антитело при помощи портативного ридера с использованием специфического коммерческого тест-картриджа. Система оказалась специфичной и эффективной для обнаружения 6000 и более спор в образце в течение 15 мин [28]. Хотя МФА является признанным методом экспресс-диагностики сибирской язвы, при его применении нередко случаи как ложноположительных результатов за счет кросс-реактивности поликлональных флуоресцирующих, особенно неадсорбированных иммуноглобулинов, обуславливающей неспецифическое свечение, так и ложноотрицательных результатов при наличии в материале атипичных форм *B. anthracis* или концентрации микроорганизмов ниже порога чувствительности анализа [8, 16, 18]. Вследствие этого люминесцентно-серологический метод рассматривается как ориентировочный и нуждается в подтверждении [8, 14]. Кроме того, он не всегда применим в полевых условиях, поскольку требует обязательного инструментального обеспечения.

Для обнаружения сибиреязвенного микроба или его специфического антигена эффективно используются различные варианты реакции преципитации. Сигнальным иммунодиагностическим методом, позволяющим уже в первый день исследования поставить предварительный диагноз, много десятилетий является реакция термопреципитации по Асколи, основанная на взаимодействии термостабильного сибиреязвенного антигена с гомологичной преципитирующей сывороткой [8, 14, 16, 18]. Существенным достоинством данного метода является его универсальность, так как он эффективен при исследовании любого, в том числе подвергнувшегося гниению материала. Однако реакция преципитации не является строго специфичной и недостаточно чувствительна [8, 16, 18]. Те же недостатки присущи двум другим преципитационным тестам – реакции иммунодиффузии в геле по Оухтерлони [8, 11, 16, 18] и официально рекомендованной для диагностики сибирской язвы реакции диск-преципитации [14, 16]. В обоих случаях отмечаются перекрестные реакции с почвенными сапрофитными бациллами, особенно *B. cereus* [14, 16], избежать которых можно, по мнению некоторых исследователей, лишь при использовании высокоспецифичной преципитирующей сыворотки [4, 8, 11, 16]. Кроме того, для исследования необходима относительно большая концентрация микроорганизмов, в связи с чем требуется подращивание культуры [16], что пролонгирует анализ.

Другим экспрессным методом иммунодиагностики сибирской язвы является реакция непрямой гемагглютинации (РНГА). В России сертифицирован «Диагностикум эритроцитарный сибиреязвенный иммуноглобулиновый сухой», производимый ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России» (г. Киров), который предназначен для выявления спор сибиреязвенного микроба в РНГА макро- и микрометодом с порогом

чувствительности  $1,56 \cdot 10^6$  и  $3,12 \cdot 10^6$  спор/мл соответственно. Несомненно перспективными представляются экспериментальные иммуноглобулиновые эритроцитарные диагностикумы на основе кроличьих антител к соматическим антигенам *B. anthracis*, продемонстрировавшие исключительную специфичность в отношении сибиреязвенного микроба различных генотипов и удовлетворительную чувствительность ( $6,25 \cdot 10^4$ – $2,5 \cdot 10^6$  м.к./мл) [4, 11]. Хотя геммагглютинационные тесты считаются достаточно достоверными [15, 18], применение эритроцитарных диагностикумов ограничивается нестабильностью входящих в их состав реагентов и меньшей чувствительностью по сравнению с некоторыми другими методами иммунодиагностики [12].

Среди современных иммунодиагностических методов наибольшей чувствительностью, воспроизводимостью и наглядностью отличаются различные модификации твердофазного иммуноферментного анализа (ТИФА, ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay, англ.) и иммуноблоттинг [3, 10, 17], которые заслуженно рассматриваются как наиболее перспективные тесты для детекции бактериальных патогенов, в том числе сибиреязвенного микроба [3, 16, 17]. В последнее время предложен целый ряд экспериментальных ELISA тест-систем для обнаружения *B. anthracis* и его антигенов. Наиболее часто их основой служат антитела к компонентам сибиреязвенного токсина – летальному фактору (ЛФ) и протективному антигену (ПА). Разработанный отечественными учеными ELISA для детекции ЛФ эффективно выявлял антиген в сыворотках крови инфицированных животных в продромальном периоде и в острой фазе заболевания в 100 % случаев, в то время как в материале из пораженных участков кожи положительная реакция зарегистрирована у 90–100 % животных [1]. R.Mabry *et al.* [32] сконструировали несколько вариантов сэндвич-ELISA для детекции ПА и ЛФ в сыворотке, которые обнаруживались до и после развития токсемии у биомоделей. С целью быстрого (в течение 1 ч) обнаружения ПА немецкими учеными разработан ТИФА на основе поликлональных кроличьих антител и моноклональных иммуноглобулинов с чувствительностью 15 и 60 нг/мл соответственно [29]. Применение МКА к ПА, полученных исследовательской группой из Индии, позволяло определять нанogramмовые количества антигена в ELISA, а эффективное выявление ПА в 22 клинических образцах методом иммуноблотта делает их перспективными для диагностики сибирской язвы [36]. В России также получены МКА, направленные к эпитомам ПА [6], с потенциальной диагностической значимостью. Однако на их основе сконструирована экспериментальная иммуноферментная тест-система, предназначенная для количественного определения соответствующего антигена в полуфабрикатах на стадиях приготовления химической комбинированной сибиреязвенной вакцины [6], но не для диагностических целей.

Иммунодиагностика сибирской язвы прово-

дится с применением некоторых альтернативных иммунологических методик. Например, хемилюминесцентный анализ (ХЛИА) позволял выявлять сибиреязвенный микроб в концентрации  $10^2$ – $10^3$  м.к./мл, а его водорастворимые антигены – 0,2–0,5 нг/мл [13]. Хотя ХЛИА отличался достаточно высокой чувствительностью, использование кроличьих поликлональных антител к живым вегетативным клеткам штамма *B. anthracis* СТИ не позволяло добиться абсолютной специфичности реакции за счет наличия в их пуле иммуноглобулинов, кроссреагирующих с близкородственными микроорганизмами. G.W.Long, T.O'Brien [31] разработали специфические иммунохроматографические тесты – дипстики для детекции ПА и спор, в которых для визуализации реакции использовано коллоидное золото. Постановка анализа технически проста и занимает 15 мин, что делает его перспективным средством экспресс-диагностики сибиреязвенной инфекции. Заслуживает внимания и другой иммунохроматографический метод обнаружения ПА, который оказался высокоспецифичным в экспериментах на крупном рогатом скоте и не давал положительной реакции при исследовании крови животных после иммунизации живой споровой вакциной [35].

Для детекции споровых форм успешно апробирован также метод проточной цитометрии с использованием гомологичных поликлональных антисывороток [37] и моноклональных антител (МКА) различных изотипов и специфичностей [39]. Израильские ученые предложили оригинальный метод, сочетающий эффект переноса энергии частотного резонанса и реакции иммунофлуоресценции [41]. Сочетание мультипараметрических возможностей проточной цитометрического анализа с иммуноокрашиванием создает новый высокоселективный и чувствительный метод. При его разработке использованы кроличьи антитела к компонентам экзоспориума *B. anthracis*. S.Farrell *et al.* [25] предложен оригинальный ультрачувствительный быстрый способ детекции спор *Bacillus globigii*, который служил суррогатным видом для *B. anthracis*. В качестве твердой фазы использованы парамагнетические бусины Dynal. Первые антитела присоединяли к бусинам стрептавидин-биотиновым методом, вторые – метили щелочной фосфатазой. Ферментативное превращение флуоресцеина дифосфата в флуоресцеин щелочной фосфатазой измеряли в реальном времени при различных длинах волн. Предел чувствительности метода составил 78 спор в пробе, продолжительность анализа – 30 мин. Использование кроличьих иммуноглобулинов G, полученных к спорам сибиреязвенного микроба, и панели синтетических углеводов позволило обнаружить высокоспецифичный тетрасахаридный компонент, присутствующий на внешней поверхности экзоспоры *B. anthracis*, который может применяться в качестве ключевого биомаркера для детекции споровых форм данного микроорганизма [40].

В рамках бурно развивающегося современного

научного направления по созданию биологических микрочипов в США сконструирована удобная в полевых условиях миниатюрная биочиповая система для выявления распыленных в воздухе спор *B. globigii* [38]. Для этого чувствительный и селективный ELISA-тест с применением нового флуорогенного субстрата щелочной фосфатазы (диметилакридинона фосфата) скомбинирован с компактной биочиповой системой детекции, которая включает в себя миниатюрный диодовый лазер. Комбинирование портативного биоаэрозольного сэмплера и микрочиповой системы дает возможность обнаруживать 100 спор *B. globigii*, что соответствует 17 спорам, распыленным в 1 л воздуха. Другая группа американских исследователей сообщает о разработке специфических сенсоров на основе антител к спорам сибиреязвенного микроба, имеющих чувствительность 300 спор/мл [23], которые остаются селективными даже в присутствии большого количества спор других видов рода *Bacillus*, в частности *Bacillus thuringiensis* и *B. cereus* [24].

Весьма интересным представляется направление исследований, связанных с совместным применением иммунодиагностических приемов и ПЦР, что обеспечивает повышение чувствительности и специфичности анализа. К примеру, сочетанное использование магноиммосорбентов с кроличьими антителами к споровым антигенам сибиреязвенного микроба и ПЦР для обнаружения *B. anthracis* в искусственно контаминированных пробах почвы, воды, грубых кормов и др. позволяло при применении оптимальной методики исследования обнаружить до 50 спор в 1 мл образца [2]. Несмотря на очень высокую чувствительность, метод, по мнению разработчиков, нуждается в совершенствовании, связанном с повышением его специфичности и оптимизацией различных этапов проведения анализа. Сочетание мультиплексного иммуноанализа на основе высокоспецифичных антител и ПЦР в реальном времени составляет основу автоматизированной автономной системы детекции патогенов, разработанной в США для быстрого выявления ряда опасных микроорганизмов, включая *B. anthracis* [27, 33].

Таким образом, на сегодняшний день как у нас в стране, так и за рубежом разработано множество различающихся по регистрируемому эффекту и технике постановки иммунодиагностических тестов, предназначенных для выявления возбудителя сибирской язвы. Тем не менее совершенствование способов обнаружения *B. anthracis* не теряет актуальности во всем мире. Это связано прежде всего с тем, что несмотря на высокую эффективность в эксперименте многие тест-системы нуждаются в дальнейшей существенной доработке, чтобы получить статус сертифицированных диагностических средств. Так, в нашей стране существует всего два коммерческих препарата для иммунодиагностики сибирской язвы: эритроцитарный сибиреязвенный иммуноглобулиновый диагностикум, упомянутый

выше, и «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие сибиреязвенные неадсорбированные сухие» («Медгамал», Москва), причем последний в соответствии с Инструкцией по применению предназначен для учебных целей. В этой связи наиболее перспективным представляется конструирование таких современных высокочувствительных тестов как ELISA, дот-иммуноанализ, иммуноблоттинг, а также изготовление дипстиков и создание иммуночипов.

Поскольку специфичность иммунодиагностических тестов определяется свойствами антител, особую важность приобретает оптимизация способов получения высокоаффинных строго специфичных иммуноглобулинов [3, 17]. Именно недостаточная специфическая активность последних, как правило, предопределяет невысокое качество разрабатываемых иммунодиагностикумов. Трудности в получении видоспецифических сибиреязвенных антител закономерны и обусловлены тесным генетическим и антигенным родством *B. anthracis* с другими представителями рода *Bacillus* [8, 16, 20, 34]. Безусловный интерес с этой точки зрения представляют гибридная биотехнология, позволяющая получить МКА, характеризующиеся стандартностью и строгой специфичностью [3, 16], использование F(ab)<sub>2</sub>-фрагментов поликлональных иммуноглобулинов [7] и с успехом апробированная на других бактериальных моделях безадсорбционная технология получения монорецепторных поликлональных антител к основным диагностически значимым антигенам патогена [21, 26]. Поэтому на современном этапе основной задачей исследований в области иммунодетекции возбудителя сибирской язвы становится разработка оригинальных высокотехнологичных подходов к изготовлению качественных иммунореагентов, а также конструирование и внедрение в практику эффективных тест-систем, адаптированных к масштабируемому серийному производству сертифицированных медицинских иммунобиологических препаратов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абалакин В.А., Сергеева Л.В., Черкасский Б.Л. // ЖМЭИ. – 1989. – № 12. – С. 63–68. – 2. Абгарян А.Г., Еременко Е.И., Ефременко В.И. и др. // ЖМЭИ. – 2003. – № 6 (Приложение). – С. 47–51. – 3. Антитела. Методы: Кн. 1 / Под ред. Д. Кэти (ред.). – М.: Мир, 1991. – 287 с. – 4. Баркова И.А., Липницкий А.В., Барков А.М., Евтеева Е.В. // Биотехнология. – 2005. – № 2. – С. 91–96. – 5. Безносов М.В., Голубинский Е.П., Родзиковский А.В., Панченко С.Г. // Карантин и зооноз. инф. в Казахстане. – 2001. – № 4. – С. 72–75. – 6. Бондарев В.П., Филиппов А.В., Дармов И.В. и др. // Пробл. особо опасных инф. – 2007. – № 1 (93). – С. 66–69. – 7. Буерова С.В., Галиуллин А.К., Хаертынов К.С. // Вет. врач. – 2001. – № 3. – С. 85–87. – 8. Бургасов П.Н., Рожков Г.И. Сибиреязвенная инфекция. – М.: Медицина, 1984. – 207 с. – 9. Воробьев А.А. // ЖМЭИ. – 2007. – № 1. – С. 105–108. – 10. Дзантиев Б.Б., Жердев А.В., Попов В.О. и др. // Клин. лаб. диагн. – 2002. – № 8. – С. 25–32. – 11. Евтеева Е.В. Внеклеточные антигены сибиреязвенного микроба и их диагностическое значение: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Волгоград, 2003. – 29 с. – 12. Каральник Б.Б. Эритроцитарные диагностикумы. – М.: Медицина, 1976. – 164 с. – 13. Коваленко А.А. Разработка хемилуминесцентного анализа для иммунодиагностики сибирской язвы: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Саратов, 1992. – 16 с. – 14. Лабораторная диагностика сибирской язвы у животных и людей, обнаружение возбудителя в сырье животного происхождения и объектах

внешней среды: Метод. указ. – М.: ВО «Агропромиздат», 1989. – 30 с. – 15. Лухнова Л.Ю., Пазылов Е.К., Мека-Меченко Т.В. и др. // Карантин и зооноз. инф. в Казахстане. – 2002. – № 6. – 56–60. – 16. Маринин Л.И., Онищенко Г.Г., Степанов А.В. и др. Микробиологическая диагностика сибирской язвы. – М.: ВУНМИЦ МЗ РФ, 1999. – 221 с. – 17. Новые методы иммуноанализа / Под ред. У.П.Коллинз. – М.: Мир, 1991. – 280 с. – 18. Онищенко Г.Г., Васильев Н.Т., Литусов Н.В. и др. Сибирская язва: Акт. асп. микробиол., эпидемиол., клин., диагн., лечения и профилактик. – М.: ВУНМИЦ МЗ РФ, 1999. – 448 с. – 19. Покровский В.И., Черкасский Б.Л. // Эпидемиол. и инф. бол. – 2002. – № 2. – С. 57–60. – 20. Смирнова Н.И., Кутырев В.В. // Мол. генет., микробиол., вирусол. – 2006. – № 2. – С. 9–19. – 21. Терешкина Н.Е. Изучение капсульных и бескапсульных форм *Vibrio cholerae* O139 с использованием поли- и моноклональных антител: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Саратов, 2004. – 23 с. – 22. Черкасский Б.Л. Эпидемиология и профилактика сибирской язвы. – М.: ИНТЕРСЭН, 2002. – 384 с. – 23. Campbell G.A., Mutharasan R. // Biosens. Bioelectron. – 2006. – Vol. 21, № 9. – P. 1684–1692. – 24. Campbell G.A., Mutharasan R. // Anal. Chem. – 2007. – Vol. 79, N 3. – P. 1145–1152. – 25. Farrell S., Halsall H.B., Heineman W.R. // Analyst. – 2005. – Vol. 130, N 4. – P. 489–497. – 26. Feodorova V.A., Gromova O.V., Devdariani Z.L. et al. // J. Med. Microbiol. – 2001. – Vol. 50, N 6. – P. 499–508. – 27. Hindson B.J., McBride M.T., Makarewicz A.J. et al. // Anal. Chem. – 2005. – Vol. 77, N 1. – P. 284–289. – 28. Hoile R., Yuen M., James G., Gilbert G.L. // Forensic. Sci. Int. – 2007. – Vol. 171, N 1. – P. 1–4. – 29. Klein-Albers C., Bohm R. // Zentralbl. Veterinarmed. B. – 1989. – B. 36, N 3. – S. 226–230. – 30. Kozel T.R., Murphy W.J., Brandt S. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – Vol. 101, N 14. – P. 5042–5047. – 31. Long G.W., O'Brien T. // J. Appl. Microbiol. – 1999. – Vol. 87, N 2. – P. 214. – 32. Mabry R., Brasky K., Geiger R. et al. // Clin. Vaccine Immunol. – 2006. – Vol. 13, N 6. – P. 671–677. – 33. McBride

M.T., Masquelier D., Hindson B.J. et al. // Anal. Chem. – 2003. – Vol. 75, N 20. – P. 5293–5299. – 34. Mock M., Fouet A. // Annu. Rev. Microbiol. – 2001. – Vol. 55. – P. 647–671. – 35. Muller J.D., Wilks C.R., O'Riley K.J. et al. // Aust. Vet. J. – 2004. – Vol. 82. – P. 220–222. – 36. Sastry K.S., Tuteja U., Batra H.V. // Indian J. Exp. Biol. – 2003. – Vol. 41. – P. 123–128. – 37. Stopa P.J. // Cytometry. – 2000. – Vol. 41. – P. 237–244. – 38. Stratis-Cullin D.N., Griffin G.D., Mobley J. et al. // Anal. Chem. – 2003. – Vol. 75, N 2. – P. 275–280. – 39. Swiecki M.K., Lisanby M.W., Shu F. et al. // J. Immunol. – 2006. – Vol. 176, N 10. – P. 6076–6084. – 40. Wang D., Carroll G.T., Turro N.J. et al. // Proteomics. – 2007. – Vol. 7, N 2. – P. 180–184. – 41. Zahavy E., Fisher M., Bromberg A., Olshevsky U. // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – Vol. 69. – P. 2330–2339.

N.E.Tereshkina, Z.L.Devdariani

### Present Status of the Anthrax Pathogen Immunodiagnosis

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov

Analysis of the recent domestic and foreign publications concerning the problems of anthrax immunodiagnosis is presented in the current review. The major achievements in the development of the procedures to detect *Bacillus anthracis* and its antigens using various immunodiagnostic assays are briefly characterized. The most important problems are discussed in connection with the efforts to increase the efficacy of the modern immunodiagnostic kits and their introduction into practice.

*Key words:* *Bacillus anthracis*, immunodiagnosis, polyclonal antibodies, monoclonal antibodies, immunodiagnostic kits.

Поступила 07.09.07.

УДК 616.981.452

Е.В.Чеботарев, А.А.Бывалов, Н.Н.Зайцева, В.В.Роман, А.В.Кожемяко

## КИСЛОРОДЗАВИСИМОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ *YERSINIA PESTIS*

ФГУ «48 Центральный НИИ Минобороны России», Киров

Предложен способ восстановления жизнеспособности замороженных при температуре минус (20±2) °С и длительно (7–16 мес.) хранившихся культур *Yersinia pestis*. Способ заключается в аэрировании 10 см<sup>3</sup> оттаявшей культуры в стеклянном флаконе вместимостью 120 см<sup>3</sup> встряхиванием на шуттель-аппарате под ватными пробками при температуре (27±1) °С. Показана кислородная и энергетическая зависимость процесса репарации поврежденных бактерий. Восстановление жизнеспособности предотвращается в атмосфере аргона, при ингибировании дыхания клеток цианидом (KCN) и разобщении окислительного фосфорилирования 2,4-динитрофенолом (2,4-ДНФ). Способность к репарации проявляют бактериальные культуры, сохранившие энергозависимую ауторегуляцию дыхательной активности, оцениваемую по предложенным параметрам дыхания, прежде всего по величине метаболического дыхательного контроля (МДК).

*Ключевые слова:* *Yersinia pestis*, репарация бактериальных клеток, метаболический дыхательный контроль (МДК).

Разработка способов поддержания и восстановления у бактериальных культур при их длительном хранении таких значимых критериев жизнеспособности, как рост и размножение в питательных средах, устойчивость к действию неблагоприятных (экстремальных) факторов внешней среды на уровне исходных параметров является одной из важных задач практической микробиологии [4].

Жизнеспособность микроорганизмов – это не только живое состояние исследуемых объектов, но и их генетическая и фенотипическая полноценность, способность нормально функционировать в различных, в том числе и в неблагоприятных усло-

виях, устойчивость и толерантность к ним, адаптационные и компенсаторные возможности, защитные свойства клеток, их ростовой и репродуктивный потенциалы [7].

При действии экстремальных факторов на живую систему, к числу которых относятся «замораживание – оттаивание», тепловое воздействие, длительное хранение бактериальных культур, имеют место следующие явления [1]: возникновение первичных повреждений структур и клеточных компонентов; развитие патологического процесса, т.е. деструктивные последствия и функциональные нарушения, вызванные выпадением или функциональным сдвигом нарушенного звена ин-