



УКРАЇНА

(19) UA (11) 61391 (13) A

(51) 7 A61B10/00, G01N33/48

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА ВИНАХІДВИДАЄТЬСЯ ПІД  
ВІДПОВІДАЛЬНІСТЬ  
ВЛАСНИКА  
ПАТЕНТУ

## (54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ЗБУДНИКА СИБІРКИ

1

2

(21) 2003010608

(22) 23 01 2003

(24) 17 11 2003

(46) 17 11 2003, Бюл. № 11, 2003 р.

(73) ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ  
УКРАЇНСЬКОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК, ІН-  
СТИТУТ БОТАНІКИ ІМ. М. Г. ХОЛОДНОГО НАЦІО-  
НАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ(57) 1 Спосіб діагностики збудника сибірки у пові-  
трі, воді і твердих субстратах, що включає мікроско-  
пію забарвлених за Грамом мікроскопічних ма-  
зків, висів контамінованого матеріалу на штучні  
живильні середовища і зараження ним чутливих  
лабораторних тварин, який відрізняється тим, що  
суспензію досліджуваного матеріалу (порошок,  
змиви з об'єктів навколишнього середовища, сте-  
рилізуючих фільтрів тощо) змішують з люмінесце-  
нтною сумішшю спеціального складу акридинової

оранжевий 1,0-1,5, спирт етиловий ректифікова-  
ний 96° -20 і димексид - 20,0, 1 %-ний водний роз-  
чин ідкого каплію - 1,0, 10 %-ний відвар лушпиння  
цибулі ріпчастої 20,0-30,0, вода дистильована до  
100 см<sup>3</sup>, нагрівають до 80-90°C і забарвлюють 20-  
30 хвилин, центрифугують 3-6 хв при 3000 об/хв,  
надосадкову рідину зливають, осад промивають 2-  
3 рази в 5-10 об'ємах фізіологічного розчину, з  
осаду готують мазки "роздавлена краплія" і дослі-  
джують в люмінесцентному мікроскопі - спори си-  
бірки яскраво оранжеві, осад висівають в живиль-  
не середовище спеціальної імунодифузійної тест-  
системи з застосуванням відомих комерційних  
антитоксичних сибіркових сироваток в мету ви-  
явлення екзотоксину збудника сибірки

2 Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що реа-  
кцію імунодифузії проводять з токсин-вакциною  
"Антракол"

Для діагностики збудника сибірської виразки  
(сибірки) застосовують велику кількість методів  
досліджень

У відповідності з найбільш поширеною схемою  
(А.С. Лабінская Микробиология с техникой мик-  
робиологических исследований - М. медицина -  
1978 - 394 с.), діагностика сибірки in vivo, прово-  
диться таким чином: у перший день досліджень  
відбирають пробу крові, мокроту або вміст сибір-  
кового карбункула хворої тварини і готують мікроско-  
пічні мазки. Один мазок фарбують за Грамом,  
другий - з метою виявлення капсульних форм ба-  
цил за Романовським-Гімаа. Підставою для поста-  
новки попереднього діагнозу на сибірку є виявлен-  
ня в пробах грампозитивних, оточених капсулою  
поодиноких паличок або їх ланцюжків та опор.  
Основний недолік способу - часта відсутність ка-  
псульних форм, в зв'язку з чим збудника сибірки  
можна сплутати з сапрофітними бацилами-  
антракоїдами Bac cereus, Bac mesentericus, Bac  
megatherium, Bac mycoides, Bac anthracoides,  
Bac pseudoanthracis. В зв'язку з цим для точного  
діагнозу необхідно виділити чисту культуру збуд-

ника і поставити біопробу на чутливих лаборатор-  
них тваринах, а потім, після їх захворювання, клі-  
нічного огляду і загибелі, знову виділити чисту  
культуру та діагностувати збудник хвороби. Таким  
чином, загальний час, необхідний для отримання  
вірогідного результату становить 8-10 діб, що не  
відповідає основній вимозі встановлення діагнозу  
в найкоротший термін для налагодження своєчас-  
них профілактичних і лікувальних заходів.

Ідентифікацію збудника сибірки проводять за  
допомогою проби сибірковим бактеріофагом (Н.Г.  
Ипатенко. Лабораторные методы исследования  
при сибирской язве // Ветеринария - 1983, №7,  
Н.Г. Ипатенко. Дифференциации Bac anthracis от  
спорообразующих и почвенных бацилл // Ветери-  
нария - 1995 - №7). Реакція досить специфічна і  
дозволяє віддиференціювати його від псевдосибір-  
кових бацил. Незважаючи на високу чутливість  
цього способу діагностики і його різних модифіка-  
цій, проба бактеріофагом вимагає попереднього  
виділення чистої культури сибірки із патологічного  
матеріалу або навколишнього середовища, на що  
іде до 48 годин. Крім того, необхідний час для

(13) A

(11) 61391

(19) UA

постановки біопроби, на що витрачається ще декілька діб. Іншим недоліком методу є те, що він діагностує не тільки патогенні, але й авірулентні штами. Слід врахувати також той факт, що у природі існують патогенні штами збудника сибірської виразки не чутливі до бактеріофага та сапрофітні бацили, які лізуються під впливом сибірського бактеріофагу (Н. Г. Іпатенко, В. А. Гаврилов, В. С. Зелепукин и др. Сибирская язва - М. Колос, 1998 - 335с).

З метою прискорення діагностики збудника сибірки застосовують тест "бурштинового намиста". При цьому на агаризоване середовище з пеніциліном, яке попередньо розливають у чашки Петрі, наносять бактеріологічною петлею трьохгодинну бульйонну культуру досліджуваного мікроорганізму. Із колоній, що виростають на згаданому середовищі, готують мазки для мікроскопії. На контрольному середовищі (без додавання пеніциліну) виростають колонії звичайних бацил, а на дослідному - колонії, утворені клітинами кулястої форми, з'єднаними у ланцюжки - "бурштинове намисто". В останньому випадку ставлять діагноз - сибірка. Однак, як і в попередньому аналізі, спосіб "намиста" не дозволяє відрізнити патогенні штами сибірки від авірулентних і, вимагає додаткових доказів. Крім відзначеного, в природі існують вірулентні бацили сибірки не чутливі до пеніциліну, а також бацили цереуса, здатні набувати кулястої форми під дією цього антибіотика.

Фармаконцерн Роше у кооперації з фірмою Gentest (США) та деякі інші дослідники для швидкої діагностики збудника сибірки, в тому числі, в складі біологічної зброї, пропонують застосовувати широковідомий метод ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція) (Frederiks D N., Relman D A. Application of polimerase chain reaction to the diagnosis of Infections diseases // Clin Infect Dis - 1999 - v 29 - p 457-458, <http://www.handelblatt.com/hbwwwanyebot/fn/reh1bi/sfn/buildhbi/on/GoArt/index.htm> 09.12.01). Оптимізм авторів щодо ефективності цього способу розділити важко, через такі причини: по-перше, для проведення ПЛР-тесту із підозрюваного матеріалу спочатку необхідно виділити чисту культуру сибірки, потім виділити і очистити ДНК, на що піде досить багато часу, по-друге, існує висока ймовірність отримання псевдопозитивного результату, внаслідок присутності ДНК антраксіду, або навпаки, псевдонегативного результату (інгібування реакції, внаслідок біологічного забруднення), по-третє, багатоетапність методики очищення і концентрування бактеріальної ДНК, як і самий аналіз, вельми трудомісткі і дорогі та вимагають створення складних стаціонарних молекулярно-біологічних лабораторій.

Найближчими до запропонованого нами способу діагностики збудника сибірки відносяться такі:

Реакція преципітації за Асколі. Її суть полягає в тому, що матеріал, підозрюваний на наявність збудника сибірки, екстрагують гарячим або холодним способом. Отриманий при цьому екстракт в кількості 0,2-0,3 см<sup>3</sup> налячують на такий же об'єм прозорої преципітуючої протисибіркової сироватки в уленгутівській пробірці. В разі позитивної реакції

(наявність антигену бацил сибірки) протягом 2 хвилин після сполучення згаданих компонентів з'являється характерне молочно-білого кольору кільце преципітації. Проте, цей спосіб має слабкі місця, а саме: а) реакція може бути позитивною навіть при відсутності життєздатних бацил і спор сибірки, що призводить до економічних втрат (знищення всієї партії тваринної сировини); б) за умови отримання негативного результату реакції преципітації з екстрактом, отриманим за допомогою гарячого способу, вимагається повторний аналіз з холодним екстрактом і навпаки, в) при розтиранні шматочків патологічного матеріалу, кормів або інших щільних субстратів у ступці з піском існує небезпека забруднення повітря чи оточуючих предметів, а також людей спорами сибірки, г) для постановки реакції Асколі потрібний стандартний антиген, що також ускладнює проведення біотеста.

Відомий люмінесцентно-серологічний метод виявлення бацил сибірки з використанням високо-специфічних імунних капсульних протисибіркових сироваток, кон'югованих з люмінесцентним фарбником. Наявність збудника сибірки констатується під люмінесцентним мікроскопом у вигляді паличок і/або їх ланцюжків, які дають зелено-жовте свідчення. Капсули світяться яскравіше. Основним недоліком цього методу є те, що свідчення можуть давати антраксіди бацили. Отже, постає необхідність підтвердження діагнозу біопробою на лабораторних тваринах.

Задачею винаходу є розробка надійного способу діагностики збудника сибірки в будь-якому матеріалі тваринницької сировини, ґрунті, воді, повітрі, в тому числі у біологічній зброї, який би відрізнявся найкоротшим терміном постановки остаточного діагнозу, високою чутливістю і простою застосування з врахуванням польових умов.

Поставлена задача досягається наступним чином:

Наважку досліджуваного на можливість контамінації збудником сибірки матеріалу (порошок, корми, шкірсировина, ґрунт тощо) в кількості 0,5-1,0 г заливають розчином фарбника у відношенні 1:2 - 1:5 такого складу: акридиновий оранжовий 1,0-1,5, спирт-ректифікат 98° і димексид - по 20,0 1% водний розчин іодного калію - 1,0, 10%-ний відвар цибулини (цибуля ріпчаста) - 30,0, вода дистильована до 100,0. Пробірку з сумішшю нагрівають 30 хв при 80-90° С, охолоджують, центрифугують, надосадочну рідину випускають. Осадок промивають 2-3 рази в 5-10 об'ємах дистильованої води. Після кожного додавання води пробу центрифугують при 3000 об/хв 5-10 хв. Після промивання осаду надосадочну рідину виливають, а з осаду готують мазки "роздавлена крапля" і досліджують під люмінесцентним мікроскопом. Спори мають яскраво оранжовий колір.

Для постановки остаточного діагнозу ставлять дослід з тест-системою. Її готують наступним чином. На дно чистої бактеріологічної пробірки вносять 0,5-1,0 см<sup>3</sup> комерційної антитоксичної сибіркової сироватки або сироватки "Антракол". На сироватку нашаровують підігрітий до 42-43°С 1%-ний прозорий гель агар-агару, приготовлений на фізіологічному розчині (0,85% водний розчин на-

трію хлористого) Пробірку ставлять вертикально до застигання агару. Після цього на поверхню агару вносять 1-2 см<sup>3</sup> рідкого живильного середовища, наприклад, м'ясо-пептонний бульйон з додаванням сироватки крові великої рогатої худоби (ВРХ) і глюкози, в яке вносять 0,2-0,3 см<sup>3</sup> суспензії забарвленого осаду. Після цього пробірки ставлять в термостат при 37°C на 12-15 годин.

Пробірки переглядають в проникаючому світлі на чорному фоні, як при обліку реакції Аскопі. За наявності в досліджуваному матеріалі збудника сибірської виразки в агаровому гелі формується кільце преципітації. В процесі росту на живильному середовищі тільки бацили сибірки продукують і виділяють назовні (за межі клітинної стінки) токсин, який, дифундуючи в агаровий гель і зв'язується анти-тілами преципітуючої сироватки. Антракоїдні бацили диску преципітації не утворюють.

Таким чином, в результаті запропонованих нами лабораторних досліджень попередній діагноз ставлять через 30 - 60 хв, остаточний - через 12 - 15 годин.

Приклади реалізації способу

Приклад 1 Порошок, підозрюваний на вміст спор сибірської виразки поміщають в пробірку в кількості 0,3 г і заливають у пропорції 1:5 розчином фарбника такого складу, акридин оранжевий 1,0-1,5, спирт-ректифікат 96° - 20,0, димексид - 20,0, 1%-ний водний розчин кафію ідкого 1,0, 10%-ний відвар цибулиння - 30,0, вода дистильована - до 100 см<sup>3</sup>. Пробірку із сумішшю нагрівають при 80°C протягом 20 хв, охолоджують, центрифугують, надосадочну рідину виливають. Осадок промивають 3 рази в 5 см<sup>3</sup> дистильованої води. Після кожного додавання води проводять центрифугування при 3000 об/хв, 7 хв. Паралельно проводять аналогічну процедуру з порошком сухого молока коров'ячого (контроль), виготовленого за ГОСТ 13264 - 70 на Яготинському молокозаводі (Київська область).

З осадків дослідної і контрольної пробірок готують мікроскопічні препарати типу "роздавлена крапля" і досліджують під люмінесцентним мікроскопом. В дослідній пробірці виявлені яскраво-оранжеві спори, в контрольній - ні.

З метою підтвердження діагнозу ставлять спеціальний біотест з комерційною антитоксичною сибірською сироваткою. В пробірці з дослідним і контрольним осадом додають по 1 см<sup>3</sup> стерильного фізіологічного розчину, перемішують і засівають по 0,2 см<sup>3</sup> суспензії на тест-системі, виготовлені як зазначено в описі винаходу. Склад живильного середовища тест-системи такий: 1 см<sup>3</sup> м'ясопептонного бульйону, 1 см<sup>3</sup> інактивованої сироватки крові ВРХ та 1% глюкози. Пробірки з тест-системою ставлять в термостат при 37°C на 12 - 15 годин. При обліку результатів імунодифузної реакції через 12 годин в дослідній пробірці виявлено характерне кільце преципітації. В контролі диск преципітації відсутній.

Приклад 2 Вода поверхневого джерела, підозрювана на зараження спорами сибірки.

В стерильні пляшки відбирають по 0,5 дм<sup>3</sup> води для дослідження на предмет контамінації її опорами сибірки. Воду фільтрують через бактеріологічні мембранні фільтри №3 (діаметр пор - 0,3 мкм)

за допомогою фільтра Зейтца. Після цього мембранні фільтри перевертають і промивають їх 100 см<sup>3</sup> фільтрату. Отриману суспензію прогрівають на водяній бані 20 хв при 75°C, охолоджують. Потім роблять серію кратних розбавлень у стерильній водопровідній воді і 1 см<sup>3</sup> суспензії засівають на чашки Петрі з застиглим агаризованим середовищем (склад середовища як в прикладі 1). Чашки Петрі ставлять в термостат при 37°C. Через 3-6 годин інкубації чашки Петрі оглядають з метою виявлення колоній, характерних для бацил сибірки. Це плоскі матово-сірі шорсткі (R-форма) колонії з бахропчастими краями або кучероподібними відростками. Підраховують загальну кількість колоній спороутворюючих мікроорганізмів та число колоній, схожих за морфологічними ознаками на колонії збудника сибірки. За допомогою бактеріологічної петлі з колоній відбирають матеріал для посіву в пробірку з біотестом, що містить антитоксичну сибіркову сироватку (як в прикладі 1). Огляд пробірок через 12 і 15 год інкубації не виявив кільця преципітації. Отже, досліджувана вода не контамінована спорами сибірки, а містила спори сапрофітних бацил.

Приклад 3 Дослідження ділянки ґрунту, що підозрюється на забруднення спорами сибірської виразки.

Методом випадкових вибірок відбирають проби ґрунту масою до 100,0 г в стерильні банки з кришками. В лабораторії з проби ґрунту випускають крупні частинки рослин, коренів тощо, ґрунт перемішують, зважують 30 г і заливають його 30 см<sup>3</sup> 0,5%-ного розчину піросульфату натрію. Суміш шутелюють 20 хв і відотонють 5 хв. Надосадкову рідину зливають і фільтрують через стерилізуючу мембрану фільтра Зейтца. Після цього фільтр промивають 10 см<sup>3</sup> стерильної водопровідної води, центрифугують 10 хв при 3000 об/хв. Надосадкову рідину зливають. Отриманий осадок ресусципнують в розчині люмінесцентного фарбника і фарбують як відзначено в прикладі 1. Аналогічно готують пробу контрольного (завідомо чистого) ґрунту. Із дослідного і контрольного осадків готують препарати "роздавлена крапля" і досліджують під люмінесцентним мікроскопом. В дослідному і контрольному зразках ґрунту виявлено спори, забарвлені в оранжевий колір. Після цього ставлять біотеста з антитоксичною сибірською сироваткою "Антракол". Дослідну і контрольну пробірки з біосистемами інокують відповідно по 0,5 см<sup>3</sup> дослідного і контрольного матеріалу і ставлять їх в термостат при 37°C. Через 12 годин інкубації виявлено чітке кільце преципітації в агаровому диску дослідної проби. Контрольний зразок ґрунту кільця преципітації не дав.

Приклад 4 В герметичній камері КПГ-1 розпилюють суспензію опору штаму *Bac anthracis*. Після цього в допомогою волюнометричного відбирача зразків з атмосфери (фірма "Буржард", Великобританія) з камери відкачують повітря впродовж 6 хв, яке пропускається через спеціальну барботажну камеру з 0,5%-ним водним розчином препарату бактеріального екзополісахариду "Бактозоль" (свідцтво на знак для товарів і послуг № 7946 від 12.07.2001р.)

Розчин прогрівають при 80°C 20 хв і центри-

фугують, надосадочну рідину зливають, осад тричі промивають, потім його змішують з розчином фарбника, фарбують, як в прикладі 1. З осаду готують препарати "роздавлена крапля" і проводять мікроскопію під люмінесцентним мікроскопом. В результаті виявлено яскраво-оранжеві спори.

З метою підтвердження попереднього діагнозу з допомогою бактеріологічної петлі з осаду відбирають посівний матеріал, яким засівають пробірку з підготовленою тест-системою і ставлять в термостат при 37°C. Шляхом візуального обліку результату реакції через 13 год інкубації виявлено чіткий диск преципітації. Отже, в пробі досліджуваного повітря містяться опори сибірської виразки.

Переваги запропонованого способу

Практично всі відомі методи діагностики сибірки вимагають обов'язкового виділення чистої культури збудника, дослідження його морфологічних і культурально-біохімічних властивостей, постановки біопроби з наступною ізоляцією із організмів загинувших лабораторних тварин збудника та його ідентифікації. На ці процедури витрачається від 7 до 10 діб, що не дозволяє своєчасно організувати відповідні лікувально-профілактичні заходи та призводить до великих втрат.

В порівнянні з відомими аналогами, запропо-

нований спосіб діагностики має низку переваг.

1. Час постановки попереднього діагнозу становить 30 - 60 хв, остаточного - до 12 - 15 год, що дозволяє оперативно вжити всі необхідні лікувально-профілактичні заходи, особливо, у випадку застосування опор сибірської виразки в якості біологічної зброї.

2. Для постановки остаточного діагнозу (проведення біотесту з антиоксичною сибірковою сироваткою) не обов'язково виділяти чисту культуру збудника сибірки, його можна проводити з накопичувальною культурою.

3. Запропонований спосіб експрес-діагностики збудника сибірки є простим, надійним і економічним. Наприклад, порівняно з ПЛР - методом, який до того ж часто дає псевдопозитивний або псевдонегативний результати, він дешевший в сотні разів і його можна втілювати в польових умовах.

4. Запропонований спосіб експрес-діагностики дозволяє максимально скоротити втрати живої сили військ і населення від зараження сибіркою при застосуванні відповідної біозброї шляхом масової імунізації людей токсин-вакциною "Антракол", яку можна вводити за допомогою безгодкового ін'єктора.