

УДК 579.2

**Ибрагимова С.М.***Республиканская противочумная станция им. С. Имамалиева  
(г. Баку, Азербайджанская республика)***МЕТОД РАДИАЛЬНОГО ЛИЗИСА ПРИ ДЕТЕКЦИИ  
BACILLUS ANTHRACIS С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БАКТЕРИОФАГА  
ДИАГНОСТИЧЕСКОГО СИБИРЕЯЗВЕННОГО**

*Аннотация.* В статье представлены данные по изоляции различных типов культур *B. anthracis* по тестовым показателям из почвы различных регионов Азербайджана. Отмечено наличие зоны лизиса под действием бактериофага Гамма А26, но на фоне которых были видны фагорезистентные колонии. С целью возможного, в перспективе, фаготипирования атипичных штаммов микроорганизмов *B. anthracis* с различными сибиреязвенными бактериофагами, полученных относительно различных типов, штаммов *B. anthracis*, автором отработан метод радиального лизиса с использованием сибиреязвенного бактериофага Гамма А26 при детекции *B. anthracis* из почвы.

*Ключевые слова:* фагоиндикация, *B. anthracis*, бактериофаг, лизогенизация, экспресс-метод.

**S. Ibrahimova***S. Imamaliyev Republican Anti-Plague Station, Baku, Azerbaijan Republic***RADIAL LYSIS METHOD IN DETECTION OF BACILLUS ANTHRACIS  
USING BACTERIOPHAGES FOR DIAGNOSTICS OF ANTHRAX**

*Abstract.* We present the data on the isolation of different types of *B. anthracis* cultures from the soil of different regions of Azerbaijan. The presence of a lyses zone is found under the influence of the phage gamma A26, against the background of which phage-resistant colonies are visible. With a view to possible phage-typing of atypical strains of microorganisms with different *B. anthracis* bacteriophages obtained with respect to different types of *B. anthracis* strains, we have worked out a method of radial lysis using the anthrax bacteriophage gamma A26 in the detection of *B. anthracis* from the soil.

*Key words:* phagedisplay, *B. anthracis*, bacteriophage, lysogenization, rapid method.

Актуальность проблематики сибиреязвенной инфекции очевидна в плане ее опасности для здоровья населения и животноводческого дела и необходимости проведения широкомасштабного мониторинга за инфекцией, особенно на территориях эндемически неблагополучных. Накопленная информация об экологии сибирской

язвы и факт выделения большого числа атипичных по своим свойствам штаммов обуславливает все большую актуальность проблемы фагоиндикации и дифференциации таких штаммов от близкородственных споробразующих сапрофитов. Определение чувствительности исследуемых культур к сибиреязвенному бактериофагу остается одним из опорных тестов при

© Ибрагимова С.М., 2014.

идентификации сибирезвенного микроба в России и за рубежом [2].

Следует отметить известный факт различия сибирезвенных бактериофагов по широте охвата лизируемых ими типов штаммов возбудителя сибирской язвы, а также по специфичности действия. Особо следует отметить применение бактериофага для диагностики сибирской язвы. Литический спектр бактериофага зависит от типа и штамма *B. anthracis*, на котором производилось его размножение. Феномен фаголизиса сибирезвенных бацилл специфическим сибирезвенным бактериофагом рассматривается как специфический метод идентификации возбудителя сибирской язвы в руководстве для сети лабораторий, созданной для реагирования на угрозу биотерроризма в США [3].

По данным Б.В. Солодовникова, диагностический бактериофаг Гамма А-26 лизирует атипичные природные «почвенные» изоляты. В этой связи следует учесть, что в природных условиях возможна встреча *B. anthracis* с умеренными фагами, в результате которой происходит лизогенизация бактерий, сопровождающаяся изменением их морфологических, культуральных, ферментативных, антигенных и биологических свойств. То есть

имеет место определенная изменчивость бактериальной клетки с утратой специфических рецепторов, в результате чего наблюдается отсутствие лизиса под действием специфического бактериофага [1; 5]. Отмеченный выше факт был показан рядом исследователей, которые выявили, что лизирующее действие фага зависит от наличия в микробной клетке соответствующих рецепторов. По их данным, вторичные культуры, полученные после воздействия фага, утрачивают тот компонент антигена, на который действовал данный фаг [7].

Учитывая малый процент выделения микроорганизмов *B. anthracis* из почвы с измененными тестовыми показателями, существовала необходимость отработки экспресс-методов презентативной индикации, способствующих увеличению объема исследований с объектов внешней среды и проведению постоянного мониторинга [6]. Целью исследований явилось изучение обсемененности почв спорами сибирской язвы районов, где была зарегистрирована заболеваемость среди людей и животных, а также отработка новых доступных для широких исследований высокопрезентативных экспресс-методов детекции *B. anthracis* в почве.

### Материалы и методы

Сбор проб почвы проводили в районах Азербайджана, где была зарегистрирована заболеваемость сибирской язвой людей с 1999 по 2012 гг.: Агджабеды, Апшерон (включая Баку), Гах и др. Наиболее устойчивые очаги инфекции были отмечены на Апшероне (включая Баку) (1999, 2000, 2001, 2005-2008

гг.), в Дивичи (2000, 2001, 2006, 2008 гг.), Шамкире (2003, 2004, 2006-2008 гг.), Гахе (2008 г., 2012 г. – вспышка).

Образцы почвы были собраны в местах забоя скота, в том числе и в частных дворах; в местах захоронения больных животных. Исследования проводили, руководствуясь «Инструк-

цией и методическими указаниями по клинической лабораторной диагностике, лечению и профилактике сибирской язвы у людей» [1]. Отобранные характерные колонии были изучены по ряду показателей: морфология колоний, типичность роста на питательных средах; МПА и МПБ, тинкториальные свойства, тест «жемчужное ожерелье», фаготипирование с применением бактериофага диагностического сибиреязвенного Гамма А-26 жидкого (ФГУЗ Ставропольский НИПЧИ, серия №3-11, дата изготовления 21.04.11 г.)

Применение бактериофага при детекции микроорганизмов спрово-

ждалось параллельным исследованием сибиреязвенных вакцинных штаммов (СТИ-2 «Вакцина сибиреязвенная живая», серия 233, ФГУ ЦНИИ Минобороны России). Исследования проведены с применением общепринятых бактериологических тестов, рекомендованных Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) [7]. Также был отработан метод радиального лизиса, основанный на непосредственной визуализации реакции лизогении: бактериофаг (лизоцим в хвостовом сегменте фага) и полисахариды микробной оболочки на поддерживающей подложке в агаровом геле.

### Результаты исследования

Нами было исследовано 120 проб почвы с указанных выше регионов и выделены 6 (5,0%) различных типов культур *B. anthracis* (по вышеотмеченным тестовым показателям). У всех тестируемых штаммов *B. anthracis* в месте нанесения бактериофага образовывались зоны лизиса, на фоне которых отмечались изолированные фагорезистентные колонии. В связи с отмеченным, нами был отработан метод радиального лизиса по детекции *B. anthracis*. Данный метод радиального лизиса основан на введении в 1% агарозный гель бактериофага в количестве 1 мл. Использовали гель при температуре 37°C, что предохраняет бактериофаг (вирус) от воздействия температур. Гели затвердевают в чашках Петри в слоях толщиной примерно 1,5 мм при нанесении его в количестве 3 мл. В них вырезали круглые лунки диаметром 2

мм, в которые вносили исследуемую пробу с помощью калиброванных микропипеток (5 мкл в 2-миллиметровую лунку). Чашки Петри оставляли во влажной камере при комнатной температуре на 2 часа для диффундирования предполагаемого возбудителя в пробе из лунки для вступления в контакт с бактериофагом. Затем чашки Петри закладывали в термостат при 37°C. Через 16-24 часа при контакте бактериофага с возбудителем образовывалась зона лизиса (рис. 1). Диаметр зоны измерялась с помощью окулярного микрометра со шкалой, одно деление которого соответствует 0,1 мм. Преимущество метода радиального лизиса состоит в экономичности относительно специфического бактериофага и возможности использования готовых подложек с лунками для серийных исследований в полевых условиях.



*Рис. 1.* Зона лизиса вокруг лунок, полученная при контакте сибиреязвенного бактериофага Гамма А-26 с вакциной сибиреязвенной живой (штамм СТИ-1).

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Инструкция и методические указания по клинической лабораторной диагностике, лечению и профилактике сибирской язвы у людей. – Саратов: Минздрав СССР, 1970. – 63 с.
2. Керимова Дж. Д. Почвенные очаги сибирской язвы и пути повышения эффективности их индикации: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 1985. – 20 с.
3. Ригвава С.А. Характеристика вирулентных штаммов *B. anthracis*, выделенных из различных географических зон Грузии / С.А. Ригвава, М.М. Натидзе, М.Е. Бубашвили и др. // Труды ин-та микробиологии НАН Азербайджана. – 2011. – Т. 9 (№ 1). – С. 193-196.
4. Сергеев О.В. Рецепторные взаимодействия вируса и клетки как начальный этап инфицирования // Вопросы вирусологии. – 2011. – № 4. – С. 4-8.
5. Солодовников Б.В. Совершенствование биотехнологии производства сибиреязвенного диагностического бактериофага: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Ставрополь, 2002. – 21 с.
6. Черкасский Б.Л. К вопросу об активности почвенных очагов сибирской язвы // Актуальные вопросы эпидемиологии и инфекционных болезней. – М.: ЦНИИ эпидемиологии, 1967. – С. 208-210.
7. Guidelines for the Surveillance and Control of Anthrax in Humans and Animals. – Geneva: World Health Organization, 1998. – 96 p.