

## **ЧАСТЬ 3**

---

### **БОЛЕЗНИ, ВХОДЯЩИЕ В СПИСОК МЭБ И ДРУГИЕ БОЛЕЗНИ, ИМЕЮЩИЕ ВАЖНОСТЬ ДЛЯ МЕЖДУНАРОДНОЙ ТОРГОВЛИ**

## **БОЛЕЗНИ, ОБЩИЕ ДЛЯ ВСЕХ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ**

---

### ГЛАВА 3.1.1.

## **СИБИРСКАЯ ЯЗВА**

### **РЕЗЮМЕ**

**Определение болезни:** Сибирская язва – болезнь, преимущественно, травоядных животных, однако она может поражать всех млекопитающих, включая людей и несколько видов птиц. Смертность, особенно у травоядных, может быть очень высокой. Этиологическим агентом является спорообразующая, грамположительная палочковидная *Bacillus anthracis*. Болезнь широко распространена в мире и является зоонозом.

**Описание болезни:** Болезнь опосредуется эндотоксинами. Зарегистрированы молниеносная, острая, подострая и, редко, хроническая формы болезни. При молниеносной и острой формах болезни прижизненные клинические признаки болезни могут фактически отсутствовать. Подострая форма заболевания может сопровождаться прогрессирующей лихорадкой, депрессией, отсутствием аппетита, слабостью, изнеможением и гибелью. При острой, подострой и хронической формах признаками болезни могут быть локализованное распухание, лихорадка; а при хронической форме единственным признаком может быть увеличенные лимфатические узлы.

**Идентификация агента.** *Bacillus anthracis* без труда поддается выделению в относительно больших количествах из крови и тканей животных, павших от сибирской язвы в недавнем прошлом; также *B. anthracis* имеет довольно характерную структуру колонии после инкубации в течение ночи на кровяном агаре. Колония довольно большая, примерно 0,3-0,5 см в диаметре. Она серо-белого до серого цвета, негемолитическая, по виду напоминающая шершавое матовое стекло, имеет очень клейкую, маслянистую консистенцию. Вегетативные клетки *B. anthracis* - большие, 3-5 мкм в длину и приблизительно 1 мкм в ширину. В конце экспоненциальной фазы роста клетки образуются эллипсоидальные центральные споры, которые не раздувают спорангий. Клетки интенсивно окрашиваются по Граму, часто *in vitro* наблюдаются длинные цепи, а *in vivo* - спаренные и короткие цепи. Визуализация инкапсулированных бацилл, обычно в больших количествах, в мазке крови, окрашенном полихромным метиленовым синим (реакция Мак-Фадьена) является однозначным диагностическим критерием.

**Серологические тесты.** Обнаружение антител в сыворотке инфицированных животных редко используется для диагностических целей, но является весьма важным инструментом научных исследований. Доминирующей процедурой на сегодняшний день является твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА).

**Требования к вакцинам и диагностическим препаратам:** Наиболее широко используемой вакциной против сибирской язвы для скота является вакцина, разработанная Max Sterne в 1937 г., которая представляет собой живые, неинкапсулированные, спорообразующие бактерии, содержащиеся в суспензии. В России и некоторых Восточно-Европейских странах используется эквивалентный тип вакцины

(штамм 55). Список производителей указан в руководстве по сибирской язве Всемирной организации здравоохранения.

## А. ВВЕДЕНИЕ

Сибирская язва – острая бактериальная болезнь главным образом травоядных животных, передается людям. Этиологическим агентом является спорообразующие, грамположительные, палочковидные *Bacillus anthracis*. Сибирская язва также известна в мире и под другими названиями, такими как антракс, болезнь сортировщиков шерсти, болезнь старьевщиков, злокачественный карбункул и злокачественная пустула.

Животные заражаются при проглатывании спор или, возможно, после укуса мух, которые питались инфицированным животным или его трупом. Инфицированных животных обычно находят павшими, так как смерть наступает в течение 24 часов. Тщательное патологоанатомическое обследование недавно павших животных может продемонстрировать любое количество поражений, из которых ни одно не будет патогномичным или полностью сообразным данной болезни. Во избежание контаминации окружающей среды патологоанатомические обследования туш животных, в отношении которых существует подозрение, что они погибли от сибирской язвы, не поощряется. Наиболее часто наблюдаемые поражения это генерализованная септицемия, часто сопровождающаяся увеличением селезенки с консистенцией «черничного джема» и плохим сворачиванием крови. Можно наблюдать кровотечения из носа, рта, влагалища и/или ануса при смерти.

Грамположительная, палочковидная *Bacillus anthracis* является облигатным патогеном. Большинство других видов *Bacillus* являются повсеместно распространенными обитающими в окружающей среде сапрофитами, некоторые из них, а именно *B. cereus*, *B. licheniformis* и *B. subtilis*, иногда ассоциируются с пищевым отравлением у людей и с другими клиническими проявлениями, как у людей, так и у животных.

### 1. Риск зооноза и требования к биобезопасности

Более 95% случаев сибирской язвы у людей имеют кожную форму и являются результатом контактирования с инфицированными тушами или шкурами, мясом или костями таких туш. *Bacillus anthracis* не является инвазивной и требует поражения для инфицирования. Защитой для ветеринаров и других людей, работающих с животными, является ношение перчаток и другой защитной одежды при работе с образцами от туш с подозрением на заражение сибирской язвой, и запрет на протирание руками лица или глаз. Риск желудочно-кишечной формы сибирской язвы может возникать у людей, которые едят мясо животных, инфицированных сибирской язвой.

Риск вдыхания инфекционных доз становится значительным при работе, связанной с переработкой побочных продуктов животного происхождения при производстве товаров (промышленная сибирская язва). Это включает дубление, производство шерсти и волос животных, ковров, переработки костей и других отраслей промышленности, где существует возможность аэролизации значительного количества спор, что повышает риск подвергания инфекционным дозам. Важно, чтобы промышленные работники использовали соответствующую защитную одежду и оборудование, и выполняли стандартные операционные процедуры, которые минимизируют риск передачи. Высокопроизводительное вытяжное оборудование должно быть расположено над щипальными, гребнечесальными, ворсовальными и прядильными машинами. Приборы,

использующие воздушные потоки, нельзя использовать для очистки оборудования по причине риска распространения спор.

С клиническими образцами и культурами *B. anthracis* следует работать ~~в условиях третьего уровня биобезопасности~~ с соблюдением соответствующих процедур по биобезопасности и сдерживанию в соответствии с анализом биологических рисков, как описано в Главе 1.1.2 *Биозащита и биобезопасность в ветеринарной микробиологической лаборатории и виварии*. Рекомендуется вакцинация лабораторного персонала.

## **В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ**

### **1. Идентификация агента**

Демонстрация инкапсулированных *B. anthracis* в мазках крови или тканей из свежих инфицированных сибирской язвой туш и выращивание организма на планшетах с кровяным агаром – относительно несложные процедуры, которые могут быть выполнены в большинстве бактериологических лабораторий. Трудности возникают со случаями болезни у свиней и плотоядных, у которых предсмертная бактериемия часто остается незамеченной, или у животных, которые перед смертью получали антибиотики.

Выделение *B. anthracis* из старых разложившихся туш, из образцов переработанных материалов (кости, мука, шкуры) или образцов из окружающей среды (контаминированная почва) часто также затруднено и требует осуществления обязательных и трудоемких процедур. Однако живые споры можно выделить из носовых раковин павшего скота и диких животных в течение длительного периода после смерти (M. Hugh-Jones, личная переписка).

### **1.1. Культивирование и идентификация *Bacillus anthracis***

#### **1.1.1. Свежие образцы**

*Bacillus anthracis* хорошо растет на многих типах питательного агара, однако лучше в качестве диагностической среды использовать агар с 5-7% лошадиной или овечьей кровью. Кровь – основной клинический материал для исследования. Мазки крови, другие жидкости организма и мазки, взятые из разрезов в тканях или органов можно нанести на планшеты из кровяного агара. После инкубации в течение ночи при 37 °C наблюдаются колонии *B. anthracis* серо-белого до белого цвета, 0,3 – 0,5 мм в диаметре, негемолитические с влажной поверхностью, напоминающей матовое стекло, и очень липкие, когда по ним проводят петлей для инокуляции. Иногда наблюдаются хвосты и выступающие пучки культуры, тянущиеся за родительской колонией, все в одном направлении. Данная характерная особенность описывалась как "голова медузы" или "кудрявые волосы". Подтверждение присутствия *B. anthracis* можно осуществить посредством демонстрации в культуре крови капсулированной, спорообразующей грамположительной палочки. Отсутствие подвижности – дополнительный тест, который можно провести.

Фаги, специфичные к сибирской язве, были впервые выделены в 1950-ых, а гамма фаг был впервые описан в 1955 г. (Brown и Cherry, 1955 г.) и быстро стал стандартным диагностическим фагом для сибирской язвы. Гамма фаг принадлежит семейству близкородственных фагов сибирской язвы (Всемирная организация здравоохранения, ВОЗ, 2008 г.).

Два теста, подтверждающих идентичность *B. anthracis*, это лизис гамма фага и восприимчивость к пенициллину. Типичная процедура для этих тестов – это произвести посев подозрительных *B. anthracis* на кровяной планшет или планшет с питательным агаром и поместить 10-15 мкм каплю суспензии фага на одну сторону посева и 10-единичный пенициллиновый диск на другую сторону. Дать капле суспензии фага просочиться в агар до инкубации планшета при 37 °С. Контрольную культуру, напр. вакцины Sterne или штамм NCTC 10340, следует тестировать одновременно с подозрительной культурой, чтобы продемонстрировать предполагаемую реакцию для лизиса гамма фага и восприимчивости к пенициллину. Если подозрительная культура является *B. anthracis*, в зоне под фагом не будет происходить рост бактерий по причине лизиса, и вокруг пенициллинового диска будет видна чистая зона, что указывает на восприимчивость к антибиотикам. Следует отметить, что некоторые полевые изоляты *B. anthracis* могут быть резистентными к фагам или пенициллину. Так как на проведение исследования по изучению лизиса гамма фага может повлиять плотность бактериального инокула, Abshire et al. (2005) рекомендуют обесцвечивание подозрительной культуры на агаровом планшете в нескольких квадрантах вместо того, чтобы использовать формат засева и инокуляции капли гамма фага на первый и второй квадрант на планшете. Если подозревается присутствие *B. anthracis*, резистентных к антибиотикам или фагам, то можно применять диагностические методы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Суспензии фага можно получить из центральных ветеринарных лабораторий или центральных медицинских лабораторий.

Фаг можно размножить и сконцентрировать в соответствии со следующим протоколом. Хранить фаг при 2-4 °С и не замораживать фаг, так как он быстро становится нежизнеспособным.

#### Этап один

- i) Распределить по поверхности планшета с кровяным агаром вакцинный штамм *B. anthracis* Sterne. Инкубировать в течение ночи при 37 °С.
- ii) Инокулировать приблизительно 10 мл питательного бульона культурой с планшета с кровяным агаром и инкубировать при 37 °С в течение приблизительно 4 часов до тех пор, пока он не станет мутным, затем охладить.
- iii) Распределить 100 мкл культуры из этапа ii на трех предварительно просушенных планшетах с кровяным агаром, инкубировать при 37 °С в течение 30 – 60 минут.
- iv) Распределить 100 мкл суспензии фага, подлежащего амплификации на тех же планшетах. Инкубировать при 37 °С в течение ночи.
- v) Собрать культуру, лизированную фагом на планшете с кровяным агаром, в 5 мл питательного бульона, затем провести второе промывание 5 мл питательного бульона. Инкубировать в течение ночи при 37 °С.
- vi) Профильтровать (0,45 мкм) и подсчитать, капая 20 мкл каплями (три капли на разведение) десятикратных разведений фильтрата в физиологическом растворе на посевах культуры *B. anthracis*, приготовленном как в этапе iii.

#### Этап два

Это практически одна и та же процедура, как и в Этапе один, обычно используется фильтрат из этапа vi, чтобы собрать фаг из планшетов.

- vii) Приготовить три засева штамма Sterne на планшете с кровавым агаром, как в этапе iii. Инкубировать при 37 °С в течение 30 – 60 минут.
- viii) Распределить 100 мкл фага из этапа vi. Инкубировать в течение ночи при 37 °С.
- ix) К 9 мл фильтрата из этапа vi, добавить 1 мл питательного бульона с 10 х концентрацией.
- x) Собрать фаг из этапа viii с 5 мл раствора из этапа ix, затем провести второе промывание 5 мл остатком раствора из этапа ix.
- xi) Добавить 10 мл 1х питательного бульона.
- xii) Инкубировать при 37 °С в течение ночи, профильтровать и подсчитать.

### Этап три

- xiii) Инокулировать 100 мл бульона с сердечно-мозговым экстрактом с приблизительно 2,5 мл культуры из этапа ii. Инкубировать на ротационном шейкере при 37 °С, пока не станет мутным.
- xiv) Добавить 20 мл фильтрата из этапа xii и продолжать инкубацию в течение ночи.
- xv) Получившийся фильтрат проверяют на стерильность и проводят титрование в десятикратных разведениях на посевах вакцинного штамма, как в этапе vi для определения концентрации фага. Она должна составлять примерно  $10^8$ -  $10^9$  бляшкообразующих единиц на мл.

### 1.1.2. Визуализация капсул

Вирулентная инкапсулированная *B. anthracis* присутствует в тканях, крови и других жидкостях организма животных, умерших от сибирской язвы. Можно приготовить тонкие мазки из крови, взятой из ушных вен или других периферийных вен, из экссудата, отобранного из различных отверстий, и в отношении лошадей и свиней, из отечной жидкости или поверхностных лимфатических узлов в районе шеи. Однако если животное мертво более 24 часов, капсулу может быть трудно выявить. Бактерии следует искать в мазках таких проб, которые были высушены, фиксированы либо с помощью тепла, либо погружая мазок в 95-100% спирт в течение минуты, и высушены на открытом воздухе, а затем окрашены полихромным метиленовым синим (реакция Мак-Фадьена). Капсулы окрашиваются в розовый цвет, тогда как клетки бацилл окрашиваются в синий. Клетки обнаруживают в парах или в виде коротких цепочек, они часто имеют прямоугольную форму на концах (цепи иногда напоминают ряд железнодорожных вагонов, так называемый внешний вид в виде вагонов или соединенных бамбуковых палочек). Окрашивание по Грамму или по Гимза капсул не обнаруживает. При выращивании *B. anthracis* аэробно на питательном агаре или в питательных бульонах капсулы отсутствуют, но их можно видеть, когда вирулентную бактерию культивируют в течение нескольких часов в нескольких миллилитрах крови (лучше всего показала себя дефибрированная кровь лошадей или овец). Альтернативно, образование капсул наблюдается при культивировании вирулентной *B. anthracis* на питательном агаре, содержащем 0,7% бикарбонат натрия, и инкубации в присутствии CO<sub>2</sub> (оптимально 20%, но и при использовании сосуда со свечой тоже получают хорошие результаты). Приготовление агара осуществляют посредством восстановления достаточного количества порошка, являющегося основой питательного агара, для получения 100 мл агара в 90 мл воды. Затем он автоклавируется и охлаждается до 50°С на водяной бане; затем добавляют 10 мл стерилизованного посредством фильтрации (фильтр: 0,22-0,45 мкм) 7% раствора бикарбоната натрия. Перемешивают и наливают в чашки Петри. Инкапсулированные *B. anthracis* будут образовывать мукоидные колонии, визуализацию

капсул можно произвести путем нанесения тонких мазков на предметные стекла, с последующей фиксацией и окрашиванием полихромным метиленовым синим (реакция Мак-Фадьена).

Полихромный метиленовый синий можно приготовить следующим образом: 0,3 г метиленового синего растворяют в 30 мл 95% этанола; 100 мл 0,01 % гидроксида калия (КОН) смешивают с раствором метиленового синего. В идеале рекомендуется оставить на открытом воздухе, периодически встряхивая, в течение, по крайней мере, одного года для окисдации и выдержки. Добавление  $K_2CO_3$  (к конечной концентрации 1%) ускоряет «созревание» красителя, но до того, как он считается диагностически надежным, его эффективность следует протестировать вместе с ранее использовавшейся функциональной партией красителя на надежных образцах. Было обнаружено, что красители, которые дают положительную реакцию на культуре *B. anthracis*, полученной искусственным путем в крови лошадей, иногда не дают положительные результаты в полевых условиях.

При подготовке мазков для окрашивания необходимо использовать только небольшие капли крови или жидкостей тканей, наилучшими являются тонкие, маленькие мазки. После закрепления (нагревая или погружая мазок в 95-100% спирт в течение 1 минуты) и высушивания маленькую (примерно 20 мкг) каплю красителя помещают на мазок и распределяют с помощью инокулирующей петли. Через одну минуту пятно промывают водой, промакивают, высушивают воздухом и рассматривают под объективом с  $\times 10$  линзами, где можно увидеть короткие цепочки в виде коротких волосков; после обнаружения их можно наблюдать при погружении в масло ( $\times 1000$ ) в виде розовых капсул, которые окружают бациллы, окрашенные в синий и черный цвет. Чтобы избежать лабораторной контаминации, слайд и фильтровальную бумагу автоклавируют или оставляют на несколько часов в 10% растворе гипохлорит натрия.

### 1.1.3. Другие образцы

Идентификация *B. anthracis* в старых разложившихся образцах, материалах, подвергнутых обработке, и образцах из окружающей среды, включая почву, возможна, но в этих пробах часто присутствуют сапрофитные контаминанты, которые на неизбирательных агарах растут быстрее, чем *B. anthracis*, и маскируют последние. Предлагаются следующие процедуры:

- а) Образец размещают в двух объемах стерильной деионизированной или дистиллированной воды и помещают на водяную баню при  $62, 5 \pm 0,5^\circ C$  на 30-60 минут.
- б) Затем осуществляют приготовление десятикратных разведений до  $10^{-2}$  или  $10^{-3}$ . Из каждого разведения 10-100 мкл наносят на кровяной агар и в некоторых случаях 250-300 мкл на PLET агар (полимиксин, лизозим, EDTA [этилен диамин тетрауксусная кислота] ацетат таллоса) (7, 11). Все планшеты инкубируют при  $37^\circ C$ .
- с) После инкубации в течение ночи чашки с кровяным агаром обследуют на наличие типичных колоний, как описано выше, а чашки с PLET агаром обследуют через 40-48 часов. Подтверждение идентичности, т.е. подтверждение, что подозреваемые колонии являются колониями *B. anthracis*, производится, как описано ранее.

Приготовление PLET среды (Kinsley, 1966; ВОЗ, 2008) производят, используя основу в виде мясо-пептонного бульона (экстракт сердца) (DIFCO), приготовленного согласно инструкциям производителя с добавлением 0,25-0,3 г/литр этилен диамин тетрауксусной кислоты и 0,04 г/литр ацетата таллия. Смесь автоклавируют и равномерно остужают до  $50^\circ C$ , затем добавляют полимиксин, 30 000 единиц/литр, и лизозим 300 000 единиц/литр. После тщательного перемешивания агар распределяют по чашкам Петри.

Существует информация о процедурах прямого обнаружения *B. anthracis* в почвах и других образцах из окружающей среды, используя полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Ни одна из данных процедур в настоящее время не используется в повседневной практике.

Если все другие методы были безрезультативными, можно рассмотреть вопрос о заражении животных для выделения *B. anthracis*. Это может производиться, например, когда образцы представлены от животных, которым перед смертью проводили терапию антибиотиками, или в случае, когда представлены образцы из окружающей среды, содержащие споростатические химические вещества. Учитывая набирающее силу движение по исключению использования животных для биологического тестирования, данный подход следует использовать в крайнем случае и только, если его использование обосновано. Из животных предпочтительнее использовать взрослых мышей или морских свинок. Если образцы включают почву, животных следует подвергнуть предварительной обработке: за день до тестирования ввести антисыворотку либо к столбняку, либо к газовой гангрене. Подготовка образцов производится как при культивировании, включая температурный шок при 62,5°C в течение 15 минут. Мышей инъецируют подкожно 0,05-0,1 мл; морских свинок заражают внутримышечно до 0,4 мл (0,2 мл в мышцу каждого бедра). Любое присутствие *B. anthracis* приводит к гибели в течение 48-72 часов, а организм можно культивировать из крови, как описано выше.

## 1.2 Иммунологическое выявление и диагностика

Следует помнить о том, что *B. anthracis* антигенно очень близкородственна *B. cereus*, которая является почти повсеместным компонентом микрофлоры окружающей среды. Единственными разными антигенами, по которым можно дифференцировать эти два вида посредством иммунологических методов, являются антигены токсина сибирской язвы, продуцируемые во время экспоненциальной фазы роста, и капсула *B. anthracis*. Это значительно ограничивает диапазон иммунологических методов, которые можно использовать в методологии рутинного обнаружения.

### 1.2.1. Тест Ascoli

В 1911 г. Ascoli опубликовал процедуру для обнаружения термостабильных антигенов сибирской язвы в тканях животных, используемых для производства побочных продуктов. В данной процедуре для продуцирования преципитиновой реакции использовалась антисыворотка, полученная в кроликах. Тест не имеет высокой специфичности: термостабильные антигены *B. anthracis* такие же, как и у других подвигов *Bacillus*, и зависят от вероятности того, что в животном будет размножаться только *B. anthracis*, и будет накоплено достаточное количество антигена для получения положительной реакции. В настоящее время данная процедура используется только в Восточной Европе.

Для проведения теста Ascoli положить приблизительно 2 г образца в 5 мл солевого раствора, содержащего уксусную кислоту в конечной концентрации 1/100, и кипятить в течение 5 минут. Полученный раствор охладить и отфильтровать через фильтровальную бумагу. В небольшую тест-пробирку помещают несколько капель кроличьей антисыворотки (приготовление сыворотки описано ниже). Фильтрат из предыдущего этапа осторожно слоем наносят сверху антисыворотки. Положительный тест – это образование видимой полосы преципитина в течение менее чем 15 минут. Следует включать суспензии положительных и отрицательных контрольных образцов.

Антисыворотку получают в кроликах посредством подкожного введения им вакцины Sterne против сибирской язвы в 1-ый и 14-ый дни. На 28-ой и 35-ый дни кроликам вводят



0,5 мл смеси из нескольких штаммов вирулентной *B. anthracis*, не более  $10^5$  колониеобразующих единиц/мл, суспендированных в солевом растворе. Альтернативно, живые вирулентные бактерии можно инактивировать посредством длительного суспендирования в 0,2% формализированном физиологическом растворе, но тогда необходимо увеличить массу антигена до  $10^8$ - $10^9$  колониеобразующих единиц/мл. Перед введением животному следует проверить суспензию на инактивацию *B. anthracis* посредством культивирования 0.1 мл в 100 мл питательного бульона, содержащего 0.1% гистидина, и посредством субкультивирования на кровяном или питательном агаре после инкубации при 37°C в течение 7 дней. Схема введения для обработанной формалином суспензии после первоначальной вакцинации на первый и 14-ый дни – это увеличивающиеся дозы в 0,1, 0,5, 1 и 2 мл, вводимые внутривенно через интервалы в 4-5 дней. После каждой процедуры следует производить тест-отбор крови на 10-ый день после последней инъекции, чтобы определить следует ли вводить дополнительные дозы по 2 мл для повышения преципитинового титра.

### 1.2.2. Иммунофлуоресценция

Несмотря на то, что в ходе научных исследований были достигнуты некоторые успехи при использовании иммунофлуоресценции для визуализации капсулы (4), данный метод не пригоден для рутинной диагностики.

### 1.3. Подтверждение вирулентности с помощью полимеразной цепной реакции

Окончательное подтверждение вирулентности можно произвести, используя полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Изложенные далее инструкции взяты из ВОЗ (2008). Матричную ДНК для полимеразной цепной реакции можно получить из свежей колонии *B. anthracis* на питательном агаре посредством ресуспендирования петли, наполненной культурой, в 25 мкл стерильной деионизированной (или дистиллированной) воды и нагревания до 95°C в течение 20 минут. После охлаждения приблизительно до 4°C и краткого центрифугирования, надосадочную жидкость можно использовать для проведения полимеразной цепной реакции.

В таблице, представленной ниже, указаны праймеры (Beyer *et al.*, 1996; Hutson *et al.*, 1993), подходящие для подтверждения присутствия pX01 и pX02 плазмид.

Цель	Идент. данные праймера	Последовательность 5' – 3''	Размер продукта	Концентрация
Защитный антиген (РА)	РА 5 3048-3029	TCC-TAA-CAC-TAA-CGA-AGT-CG	596 т.п.н.	1мМ
	РА 8 2452-2471	GAG-GTA-GAA-GGA-TAT-ACG-GT		
Капсула	1234 1411-1430	CTG-AGC-CAT-TAA-TCG-ATA-TG	846 т.п.н.	0,2 мМ
	1301 2257-2238	TCC-CAC-TTA-CGT-AAT-CTG-AG		

Полимеразную цепную реакцию можно проводить в объемах по 50 мкл, используя указанные выше праймеры, по 200 мкМ каждой из dATP, dCTP, dTTP и dGTP, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub> и 2,5 единиц AmpliTaq® полимеразы<sup>1</sup>, все в NH<sub>4</sub> буфере с последующим

<sup>1</sup> Этот продукт продается Applied Biosystems; (<https://www.appliedbiosystems.com>)

добавлением 5 мкл матричной ДНК. Выявлено, что работа с этими малыми фрагментами лучше всего протекает при использовании 2% агарозного геля.

Альтернативно, в Pharmacia Biotech<sup>2</sup> можно приобрести гранулы Ready-to-Go™ (гранулы готовые к использованию). Эти гранулы представляют собой предварительно смешанные, дозированные, высушенные гранулы, стабильные при комнатной температуре, содержащие все необходимые реагенты, кроме праймера и матрицы, для проведения 25 мкл полимеразных цепных реакций. Матрицу можно добавлять в объеме 2,5 мкл.

Можно использовать следующий цикл проведения полимеразной цепной реакции: 1 x 95°C в течение 5 минут; 30 x 95°C в течение 0,5 минуты с последующим этапом: 55°C в течение 0,5 минуты, затем - 72°C в течение 0,5 минуты; 1 x 72°C в течение 5 минут, охлаждение до 4°C.

Следует отметить, что праймеры, указанные в таблице выше, давали хорошие результаты в плане подтверждения присутствия или отсутствия рХ01 и/или рХ02 в чистых культурах изолятов от животных (включая человека) или в образцах и пробах из окружающей среды. Но, однако, они не подходят для прямого обнаружения *B. anthracis* в таких пробах и образцах. Альтернативные варианты можно найти в работах Jackson *et al.* (1998) и Ramisse *et al.* (1996). В тех редких случаях, когда изолят может не содержать обе рХ01 и/или рХ02, следует также использовать хромосомный маркер, праймеры для него также указаны в работах Jackson *et al.* (1998) и Ramisse *et al.* (1996).

## **С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ И ДИАГНОСТИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ**

### **1. Историческая справка.**

#### **1.1. Целесообразность и предполагаемое использование продукта**

Наиболее широко используемой вакциной для профилактики сибирской язвы у животных является вакцина, разработанная Sterne в 1937 г. Он получил приблизительный вариант вирулентной *B. anthracis* из культуры на сыровороточном агаре в атмосфере с повышенным содержанием CO<sub>2</sub>. Данный вариант, обозначенный как 34F2, был не способен образовывать капсулу и, как было установлено впоследствии, утратил рХ02 плазмиду, которая кодирует образование капсулы. Он стал наиболее широко используемым по всему миру штаммом для производства вакцины против сибирской язвы у животных. В Центральной и Восточной Европе активным ингредиентом для современной вакцины для скота является эквивалентный рХ02 дериват, штамм 55. Список производителей вакцины против сибирской язвы для животных представлен в Приложении 5 работы ВОЗ (2008).

Представленная ниже информация по приготовлению вакцины против сибирской язвы, которая используется для животных, базируется на данных из работ Misra (1991) и ВОЗ (1967). Описаны обобщенные процедуры; национальным законодательным властям следует проконсультироваться в отношении Стандартных производственных процедур, которые могли бы подойти к местным условиям.

### **2. Производство и минимальные требования к традиционным вакцинам**

#### **2.1. Характеристики посевного материала**

---

<sup>2</sup> GE Healthcare <https://www.gelifesciences.com>

## 2.1.1. Биологические характеристики

В основе производства вакцины против сибирской язвы лежит система производства посевного материала партиями. Партия посевного материала – количество спор однообразной композиции, обрабатываемое за один промежуток времени и сохраняемое для производства вакцины. Каждая партия посевного материала должна быть материалом не более трех пассажей от родительской культуры и должна продуцировать вакцину, которая является эффективной и безопасной для животных. Рекомендуется готовить из родительского штамма большую партию посевного материала и производить её консервацию посредством лиофилизации для будущих производственных партий. Родительскую культуру можно купить<sup>3</sup>.

## 2.1.2. Критерии качества

Партия посевного материала приемлема для производства вакцины против сибирской язвы, если вакцина, приготовленная из этой партии посевного материала или суспензия, собранная с культуры, полученной из данной партии посевного материала, отвечают требованиям по контролю конечного нефасованного продукта в отношении свободы от бактериальной контаминации, безопасности и эффективности (иммуногенности).

## 2.2. Метод производства

### 2.2.1. Процедура

#### i) Приготовление исходного посевного материала

Партии посевного материала культивируют на твердых средах, состав которых способствует споруляции организма (смотри Раздел С 1.2., представленный ниже). Состав твердой среды изложен в работе под № 9 и является следующим: 50 г триптического перевара казеина; 10 г дрожжевого экстракта; 0,1 г  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0,01 г  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,05 г  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,03 г  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 5,0  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 1,0 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 22 г агара; 1000 мл деионизированной или дистиллированной воды. Ингредиенты растворяют в воде, нагревая до соответствующей степени, раствор доводят до уровня pH 7,4, и разливают в матрасы Ру (по 120 мл в один матрас) или в другой подходящий контейнер, стерилизуют автоклавированием и охлаждают в горизонтальном положении. После отвердевания агара, производят асептическое удаление излишней жидкости, матрасы оставляют в термостате (37°C) в течение, как минимум, 2 часов для высыхания, а затем проверяют их на стерильность.

Распloidку для вакцины в объемах по 2 мл, полученную из справочной лаборатории, следует нанести на агар в матрасах Ру, а затем инкубировать при 37°C до тех пор, пока при микроскопическом исследовании образцов, асептически экстрагированных с использованием петли, не будет наблюдаться, как минимум, 80% споруляция (не менее 72 часов). Культуру собирают во флаконы со стерильной деионизированной или дистиллированной водой, 10 мл на один флакон, и проверяют на чистоту. После отмывания, три раза в стерильной деионизированной или дистиллированной воде с конечной суспензией, также в стерильной деионизированной или дистиллированной

<sup>3</sup> Коллекции культур Агентства по охране здоровья, Агентство по охране здоровья, Микробиологические услуги, Porton Down, Salisbury, SP4 OJG, Соединенное Королевство (<http://www.hpacultures.org.uk/>)

воде, добавляют стерилизованный стабилизатор для лиофилизации, суспензию помещают в колбы для лиофилизации и лиофилизируют.

Аттенуированные вакцинные штаммы могут постепенно терять антигенные свойства в условиях повторного субкультивирования. В связи с этим, рекомендуется заготавливать посевной материал в больших количествах и хранить в течение трех пассажей от первоначальной посевной культуры. Необходимо приготовить большое количество исходного посевного материала.

#### ii) Приготовление и тестирование рабочего посевного материала

Произвести восстановление исходного посевного материала в колбе и инокулировать несколько «косячков» (приблизительно 10 мл) агара для споруляции (казеиновый перевар). Инкубировать при 37°C в течение 72 часов и хранить в холодильнике. Протестировать «косячки» на чистоту посредством культивирования в чашках с питательным агаром и в питательном бульоне (0,1 мл в 100 мл питательного бульона). Последний после инкубации при 37°C в течение 7 дней следует подвергнуть пассированию на питательном агаре; он должен представлять собой чистую культуру *Bacillus anthracis*. Образец бульонной культуры следует проверить на отсутствие подвижности.

Объемы посевного материала необходимые для одного производственного цикла определяют исходя из урожая спор из каждого «косячка», собранного с помощью 10 мл стерильной деионизированной или дистиллированной воды, и использования его для инокуляции пяти матрасов Ру.

#### iii) Приготовление вакцинного концентрата

Подготовку матрасов Ру с агаром в виде казеинового перевара производят как описано для исходного посевного материала в разделе С.2.2.1.i выше. С одного матраса Ру можно ожидать получения 2000 доз вакцины. В каждый матрас Ру вводят 2 мл суспензии рабочего посевного материала и инкубируют при 37°C в течение нескольких дней, закрыв пористыми пробками, пока в небольшой пробе культуры, отобранной с помощью петли из произвольно выбранных матрасов, при исследовании во влажных микропрепаратах посредством фазового контрастирования (фазово яркие споры) или последующего окрашивания спор не будет продемонстрировано, что, как минимум, 90% организмов находится в спорулированной форме. Затем производят сбор культуры из каждого матраса с использованием 20 мл физиологического солевого раствора. Тесты на наличие контаминантов осуществляют посредством пересева на планшеты с питательным агаром и инокуляции 100 мл питательного бульона 0,1 мл собранных спор, с последующим пересевом на питательный агар через 7 дней при 37°C и тестированием на подвижность. Подходящие урожаи (т.е. демонстрирующие отсутствие контаминации) объединяют в пул.

#### iv) Обработка глицерином

В нерасфасованную массу пула добавляют двойной объем стерильного, чистого, нейтрального глицерина. На данном этапе можно также добавить сапонин (итоговая концентрация: 0,1%), если он подлежит включению в качестве адьюванта. Тщательно перемешать (может быть полезным включение стерилизованных стеклянных гранул). Провести тест на чистоту, как описано выше, и оставить на 3 недели при температуре

окружающей среды для лизиса любых вегетативных бактерий, определить балльные показатели для жизнеспособных спор, впоследствии хранить в холоде.

v) Определение титра и разведение для использования

Затем определяют количество способных к культивированию спор в продукте посредством помещения десятикратных разведений на планшеты с питательным агаром, распределяя их по поверхности. Суспензию разбавляют таким образом, чтобы итоговая масса содержала желаемое количество способных к культивированию спор. Разбавитель должен содержать солевой раствор, глицерин и (если он включен) сапонин в тех же пропорциях, в каких они присутствуют в вакцинном концентрате. Вакцина должна содержать не менее  $2-10 \times 10^6$  жизнеспособных спор в одной дозе для КРС, буйволов и лошадей и не менее  $1-5 \times 10^6$  спор в одной дозе для овец, коз и свиней.

vi) Фасовка в контейнеры

Фасовка равных количеств вакцины в контейнеры на одну или несколько доз осуществляется, как указано в отчетах Всемирной организации здравоохранения (1965). В целом, конечный нефасованный продукт расфасовывается по контейнерам асептически на участке, не используемом для производства, необходимо исключить любую контаминацию или изменение. После процесса расфасовки в контейнеры соответствующей дозировки вакцину можно лиофилизировать. Контейнеры как можно скорее запечатывают материалом, безвредным для продукта и способным сохранять герметичность в течение всего срока годности вакцины.

### 2.3 Требования к субстратам и средам

Обратитесь к Misra (1991) для подробной информации по субстратам и питательным средам, используемым для производства вакцины против сибирской язвы.

#### 2.3.1. Контроль в процессе производства

i) Чистота посевного материала

Тесты на чистоту включают обследование под микроскопом окрашенных мазков с культурами и тесты на подвижность, как указано в разделе С.2.2.

ii) Безопасность посевной партии

Каждой из трех здоровых невакцинированных овец в возрасте 1-2 лет вводят подкожно не менее чем  $5 \times 10^9$  способных к культивированию спор. Овцы должны оставаться в живых в течение всего периода наблюдения, который составляет не менее 10 дней.

iii) Иммуногенность посевной партии

Как минимум 10 здоровых морских свинок весом 300-500 г заражают  $5 \times 10^6$  жизнеспособными спорами и обследуют в течение 21 дня. Должно выжить как минимум 80% животных. Затем иммунизированных животных вместе с тремя неиммунизированными контролями контрольно заражают 10 средними летальными дозами ( $LD_{50}$ ) штамма 17 JB *B. anthracis*. В течение 10-ти дневного периода наблюдения ни одна из иммунизированных мышей не должна погибнуть от контрольного заражения,

тогда как все контроли должны умереть от сибирской язвы. Если одно из иммунизированных животных умерло, тест следует повторить.

### **2.3.2. Контроль партии и тесты, осуществляемые на конечном продукте**

#### **i) Стерильность**

Вакцина представляет собой живую культуру спор *B. anthracis*; тест на стерильность не проводится, но партии должны тестироваться на свободу от контаминации (см. Главу I.1.9. Тесты на стерильность и свободу от контаминации биологических материалов).

#### **ii) Безопасность**

Тестирование на безопасность проводится на двух здоровых овцах или козах, которым внутримышечно дважды вносят рекомендуемые вакцинные дозы. За животными наблюдают в течение 10 дней. Конечная партия проходит тестирование в случае отсутствия системных реакций и при наличии кратковременного отека в месте введения вакцины. Если тест проводится только на овцах, нарастающий отек указывает на то, что вакцина может быть непригодной для коз.

#### **iii) Эффективность**

Тестирование на эффективность или иммуногенность проводится на конечном нефасованном продукте следующим образом: как минимум 10 здоровых морских свинок весом 300-500 г заражают дозой вакцины для овец. За морскими свинками наблюдают в течение 21 дня, как минимум 80% животных должны остаться в живых в течение периода наблюдения. Выживших иммунизированных морских свинок и трех невакцинированных контролей контрольно заражают соответствующей дозой вирулентной *B. anthracis*. Для контрольного заражения рекомендуется использовать 200 ЛД<sub>50</sub> (ЛД-летальная доза) штамма Пастера II (17JB), который можно получить там же, где и штамм вакцины Sterne 34F2. Если к 10-ому дню после контрольного заражения все вакцинированные морские свинки остались в живых, а контрольные животные умерли, то конечный нефасованный продукт признается удовлетворительным. В случае смерти любого их вакцинированных животных во время периода наблюдения после контрольного заражения, но не от сибирской язвы, а по другой причине, и в случае, когда смерть не ассоциирована с вакциной, тест можно повторить.

## **2.4. Требования для получения разрешения**

### **2.4.1. Требования к безопасности**

#### **i) Безопасность в отношении вакцинируемых целевых и нецелевых видов животных**

Выявлено, что вакцина может быть причиной болезни у некоторых коз и лам; это может быть связано с сапонином, который используется в качестве адьюванта. Вакцину не рекомендуется использовать для беременных животных, а также для животных, предназначенных для убоя в течение 2-3 недель после вакцинации. В некоторых странах или регионах местными постановлениями могут быть установлены другие временные периоды, но научно обоснованных причин считать мясо от клинически здоровых животных непригодным для

потребления человеком и для работы, осуществляемой людьми после периода выдерживания в течение 2 недель после вакцинации, не существует. Одновременное введение антибиотиков вакцинируемым животным противопоказано, поскольку антибиотики будут подавлять действие вакцины. Оставшаяся вакцина, пустые флаконы и оборудование, применявшееся для вакцинации, контаминированы живыми спорами и подлежат автоклавированию, дезинфекции и сжиганию. При случайном введении человеку следует из места инъекции выдавить как можно больше инокулята и обильно промыть рану водой с мылом. При развитии заражения следует обратиться к врачу.

ii) Реверсивная вирулентность аттенуированных/живых вакцин

Штамм 34F2 *B. anthracis* считается стабильным, и не способным продуцировать капсулу *in vitro*.

iii) Охрана окружающей среды

Остатки вакцины, пустые флаконы и инструменты, использующиеся для вакцинации, заражены живыми спорами и должны подвергаться автоклавированию, дезинфекции или инсенирации.

#### 2.4.2. Требования к эффективности

i) Для животноводческого производства.

Не применимо.

ii) Для контроля и искоренения

Рекомендуемая доза для КРС и лошадей – минимум  $2 - 10 \times 10^6$  способных к культивированию спор; для овец, коз и свиней –  $1 - 5 \times 10^6$  способных к культивированию спор. Вакцина должна содержать эти споры в соответствующем объеме, например,  $2 \times 10^6$ /мл. Хороший иммунитет сохраняется в течение, как минимум, одного года, рекомендуется ежегодно проводить ревакцинацию. У лошадей после первоначальной вакцинации выработка иммунитета может происходить медленно, поэтому некоторые производители рекомендуют при первоначальной вакцинации вводить две дозы с интервалом в один месяц с последующей ежегодной ревакцинацией одной дозой.

Споры *Bacillus anthracis* стабильны и в нелиофилизированной, и в лиофилизированной вакцинах, консерванты не требуются. Рекомендуется хранение в холодильнике ( $4^{\circ}\text{C}$ ).

Поскольку общепринятого теста на стабильность для вакцин против сибирской язвы не существует, рекомендуется для каждой расфасованной партии определять количество способных к культивированию спор до и после выдерживания при определенной температуре в течение определенного периода. Количество способных к культивированию спор не должно уменьшаться.

### 3. Вакцины на основе биотехнологических разработок

### 3.1. Доступные вакцины и их преимущество

Вакцин против сибирской язвы на основе биотехнологических разработок не существует.

### 3.2. Особые требования к вакцинам на основе биотехнологических разработок

Не применимо.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

ABSHIRE T.G., BROWN J.E., & EZZELL J.W. (2005). Production and validation of the use of gamma phage for identification of *Bacillus anthracis*. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 4780–4788.

ASCOLI A. (1911). Die Präzipitindiagnose bei Milzbrand. *Centralbl. Bakt. Parasit. Infectk.*, **58**, 63–70.

BEYER W., GLOCKNER P., OTTO J. & BOHM R. (1996). A nested PCR and DNA-amplification-fingerprinting method for detection and identification of *Bacillus anthracis* in soil samples from former tanneries. *Salisbury Med. Bull.*, No. 87, Special Suppl., 47–49.

BROWN E.R. & CHERRY W.B. (1955). Specific identification of *Bacillus anthracis* by means of a variant bacteriophage. *J. Infect. Dis.*, **96**, 34–39.

EZZELL J.W. & ABSHIRE T.G. (1996). Encapsulation of *Bacillus anthracis* spores and spore identification. *Salisbury Med. Bull.*, No 87, Special Suppl., 42.

HUTSON R.A., DUGGLEBY C.J., LOWE J.R., MANCHEE R.J. & TURNBULL P.C.B. (1993). The development and assessment of DNA and oligonucleotide probes for the specific detection of *Bacillus anthracis*. *J. Appl. Bacteriol.*, **75**, 463–472.

JACKSON P.J., HUGH-JONES M.E., ADAIR D.M., GREEN G., HILL K.K., KUSKE C.R., GRINBERG L.M., ABRAMOVA, F.A. & KEIM P. (1998). PCR analysis of tissue samples from the 1979 Sverdlovsk anthrax victims: The presence of multiple *Bacillus anthracis* strains in different victims. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **95**, 1224–1229.

KNISELY R.F. (1966). Selective medium for *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.*, **92**, 784–786.

MISRA R.P. (1991). Manual for the Production of Anthrax and Blackleg Vaccines. Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO) Animal Production and Health Paper 87, FAO, Rome, Italy.

RAMISSE V., PATRA G., GARRIGUE H., GUESDON J.L. & MOCK M. (1996). Identification and characterization of *Bacillus anthracis* by multiplex PCR analysis of sequences on plasmids pXO1 and pXO2 and chromosomal DNA. *FEMS Microbiol. Lett.*, **145**, 9–16.

STERNE M. (1937). The effect of different carbon dioxide concentrations on the growth of virulent anthrax strains. *Onderstepoort J. Vet. Sci. Anim. Ind.*, **9**, 49–67.

TURNBULL P.C.B., FRAWLEY D.A. & BULL R.L. (2007). Heat activation/shock temperatures for *Bacillus anthracis* spores and the issue of spore plate counts versus true numbers of spores. *J. Microbiol. Methods*, **68**, 353–357.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (1965). General Requirements for Manufacturing Establishments and Control Laboratories: Distribution of aliquots of vaccine into single and multidose containers. Requirements for Biological Substances No. 1. WHO Technical Report No. 363. WHO, Geneva, Switzerland, 16–17.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (1967). World Health Organization Expert Committee on Biological Standardization Requirements for Anthrax Spore Vaccine (Live – for Veterinary Use). Requirements for Biological Substances No. 13. WHO Technical Report Series No. 361. WHO, Geneva, Switzerland.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2008). Anthrax in humans and animals, Fourth Edition. WHO Press, World Health Organization, Geneva, Switzerland.

\*

\* \*



**NB:** Существуют Справочные лаборатории МЭБ по сибирской язве (см Таблицу в Части 4 этого Кодекса на наземным животным или обновленные списки на сайте МЭБ: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>). Обратитесь в Справочные лаборатории МЭБ для получения дальнейшей информации по диагностическим тестам, реагентам и вакцинам против сибирской язвы.