

УДК: 619:616.981,51;615,371:372

ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ БИОБЕЗОПАСНОСТИ И БИОЗАЩИТЫ ПРИ СИБИРСКОЙ ЯЗВЕ

Белоконов И. И., Гринченко Д. Н.

Харьковская государственная зооветеринарная академия, г. Харьков, Украина

Стегний Б. Т.

Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины», г. Харьков, Украина, e-mail: admin@vet.kharkov.ua

Приведены результаты анализа и оценки риска новых вспышек сибирской язвы, а также сведения о возможности применения спор бациллы антракса в качестве оружия биотерроризма и важнейшие этапы создания средств биозащиты. Представлены результаты электронно-микроскопических исследований спор сибиреязвенного микроба, как возможного агента биотерроризма.

Ключевые слова: антракс, биобезопасность, биозащита, споры, электронная микроскопия.

Сибирская язва (сибирка, anthrax – англ., milzbrand – нем., febris carbunculosa – лат.) – острая инфекционная болезнь домашних и диких животных, а также человека, протекающая с явлениями септицемии или образованием карбункулов, известная человеку с глубокой древности [1, 2, 3]. Населенный пункт, в котором когда-либо возникло заболевание животных или людей сибирской язвой, считается традиционно неблагополучным [4, 7].

Наличие на территориях многих стран стационарно неблагополучных по сибирской язве очагов, а также множества старых скотомигильников - природных резервуаров бациллы антракса и возможности их размывов при наводнениях или разрушения в процессе боевых действий, значительно увеличивается риск вспышек сибиреязвенной инфекции [6, 7].

Кроме того, необходимо помнить о трагичном опыте и возможности использования сибиреязвенного микроба в качестве биологического агента для совершения террористических актов и создания оружия массового поражения [12, 13, 14]. После биотеррористической атаки в США в 2001 году согласно центра контроля и предотвращения болезней к наиболее вероятным агентам биотерроризма (к особо опасным патогенам категории А) были отнесены только возбудители сибирской язвы, туляремии, чумы, оспы, вируса Эбола и ботулинический токсин [14].

Наиболее вероятный способ применения спор в качестве биологического оружия возможен метод распыления аэрозоля, содержащего жизнеспособные споры возбудителя. В связи с этим, среди пораженных будут преобладать больные люди и животные с легочной формой болезни, сопровождающейся высокой смертностью. Расчетной ЛД₅₀ (средняя летальная доза) для человека составляет 800–1000 спор. Экспертами ВОЗ установлено, что через три дня после применения 50 кг спор на протяжении двухкилометровой зоны по направлению ветра в сторону города с населением в 500 тыс. человек, будут поражены 125 тыс. (25 %) жителей, с 95 тыс. жителей (76 %) летальных исходов [8].

В течение многих десятилетий возникал один вопрос, как предотвратить эту болезнь. Первую вакцину против сибирской язвы удалось создать более чем 100 лет назад Л. Пастеру [1, 2, 4]. Используя свой опыт работы с микроорганизмами и методику Л. Пастера, Л. Ценковский в 1888 году получил новую вакцину против сибирской язвы. Предложенные вакцины Пастера и Ценковского были достаточно реактогенными и не могли быть использованы для людей. В результате многочисленных популяционных исследований в Санитарно-техническом институте был получен безкапсульный штамм «СТИ-1». Этот штамм проявлял выраженную вирулентность на белых мышах, морских свинках и не был патогенен для кроликов и овец [5, 7]. Штамм «СТИ-1» по своим культуральным, морфологическим и проведенными нами электронно-микроскопическим характеристикам является типичным сибиреязвенным микробом с характерной отличительной особенностью – это полная утрата формировать капсулу как *in vivo*, так и *in vitro*. Изготовленная вакцина «СТИ» на основе этого штамма была предложена для иммунизации животных. Она имела не высокую реактогенность и была совершенно безвредной, что послужило основанием для разработки на основе данного штамма вакцины, предназначенной для людей [12].

В конце 80 – х годов, была изготовлена новая вакцина из безкапсульного штамма 55 – ВНИИВВ и М во ВНИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии, которая имела существенное преимущество перед вакциной «СТИ-1» – большую иммуногенность и значительно меньшую патогенность. В настоящее время эта вакцина выпускается в России в жидкой концентрированной, лиофилизированной форме, а также в форме супер концентрированного иммуногена [3].

В 1990 – х годах была создана сухая форма комбинированной вакцины, состоящей из живых спор ослабленного штамма и протективного антигена, сорбированного на геле гидроксида алюминия. Эта вакцина имеет более выраженные защитные свойства [3].

В США и ряде других стран для вакцинации людей против сибирской язвы используется инактивированная вакцина, выпускаемая Bio Port Corporation. Она представляет собой безклеточный фильтрат культуры *Bac. anthracis* V770-NRI-R. Фильтрат содержит смесь продуктов жизнедеятельности *Bac. anthracis*, в том числе и протективный антиген. Компоненты вакцины адсорбированы на гидрате алюминия, который используется в качестве адьюванта. Данная вакцина имеет ряд недостатков, касающихся сложности графика вакцинации, оценки иммуногенности и безопасности при внутримышечном введении [7, 8, 11].

Перспективним направлением в создании вакцин против сибирской язвы является генная инженерия с использованием плазмид P α 01 (P α g, Lefa, Су α) и P α 02. Подобные исследования ведутся в ряде лабораторий мира по нескольким направлениям. Одно из них – конструирование рекомбинантных штаммов, продуцирующих протективный антиген [8]. Ген P α g внедряют в геном других бактерий, например *Bac. subtilis* или *Bac. cereus*, которые затем становятся продуцентами защитного антигена в значительно большем количестве, чем сами бациллы антракса. Более перспективным направлением в создании вакцин нового поколения является конструирование продуцентов, которые бы вырабатывали не всю субъединицу протективного антигена, а только его иммуногенные элементы. Для этого необходимо вставить в геном бактерии-продуцента лишь ту часть гена P α g, которая детерминирует синтез этих антигенов.[8, 9, 15].

В США зарегистрирован патент на метод приготовления химической вакцины на основе протективного антигена (ПА) продуцируемого аспорогенным штаммом *B. anthracis* Sterne-1 (Ppa 102) CR4 (Ivines B. et al. 2002) [14].

В лаборатории прикладной генетики Рос. НИПЧИ «Микроб» сконструирован аспорогенный рекомбинантный, авирулентный продуцент протективного антигена – *B. anthracis* 55 ТПА-1(Spo-). Ген, детерминирующий синтез протективного антигена, локализован в составе плазмиды pUB110PA-1. Штамм *B. anthracis* 55 ТПА-1 (Spo-) стабильно наследует гибридный репликон, не реверсирует к спорообразующему фенотипу и характеризуется низкой активностью протеолитических ферментов [10, 11].

Однако применение живых споровых вакцин из ослабленных безплазмидных и безкапсульных штаммов в ряде стран остается на неопределенное время основным способом профилактики сибирской язвы среди животных. В связи с этим поиски новых высокоиммуногенных штаммов и разработка на их основе новых вакцин будут продолжены.

Необходимо также учитывать, что противосибирезвенные вакцины лишь предупреждают заражение животных, но не устраняют постоянные угрозы возникновения болезни, так как возбудитель сибирской язвы может десятилетиями находится в почве и других объектах внешней среды в виде спор в тех местах, где погибли или были захоронены животные больные сибирской язвой. Эти места не всегда известны и обозначены на местности. Почвенные сибирезвенные очаги трудно обезвредить и поэтому всегда существует угроза заражения животных.

Приведенные основные биологические свойства спор бациллы антракса, характеризуют их уникальность, что вызывает повышенный интерес к изучению их субмикроскопического строения с привлечением электронной микроскопии высокой разрешающей способности.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования были использованы споры вакцинных сибирезвенных штаммов СТИ-1, № 55, 2-й вакцины Ценковского и общепринятые методы люминесцентной, фазовоконтрастной и электронной микроскопии.

Результаты исследований. Строение спор возбудителя сибирской язвы исследовали в культурах возраста более 3-х суток. В этот период споры имели все признаки зрелых клеток и характеризовались наличием оптически плотной цитоплазмы (спороплазмы), имеющей чаще всего гомогенное строение. Лишь в отдельных случаях удавалось обнаружить структуры характерные для вегетативных клеток (ядро, мембранные структуры, рибосомы). Спороплазма снаружи была окружена мембраной (оболочкой) толщиной около 15–20 нм, в которой местами выявлялись два слоя. На поверхности мембраны располагался массивным слоем кортекс (кора) толщиной 100–120 нм в виде осмиофобного компонента у одних или в виде слоистого строения у других. Снаружи кортекс был покрыт споровой оболочкой толщиной 30–35 нм состоящей из двух слоев.

По окружности наружного слоя споровой оболочки располагался в виде тонкой мембраны толщиной 15–20 нм экзоспориум, на поверхности которого располагалась сеть ворсинок, в ряде случаев напоминающих шипы (Рис. 1, 2, 3, 4).

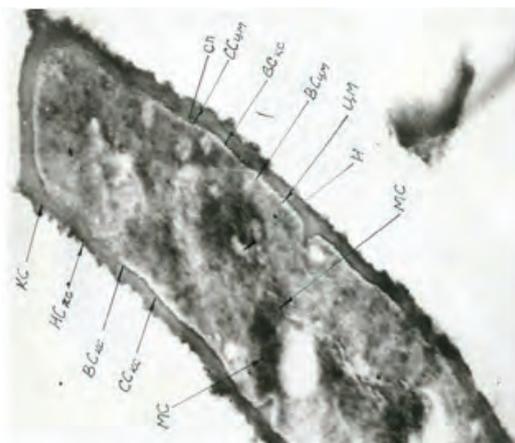


Рис. 1. Фрагмент ультратонкого среза сибирезвенной бациллы, штамм СТИ-1, 6-ти часовая культура. Клеточная стенка (КС), цитоплазматическая мембрана (ЦМ), рибосомы (Р). Начало деления клетки, мембранные структуры(М.С.), нуклеоид (Н). рибосомы (Р). Начало деления клетки, мембранные структуры(М.С.), нуклеоид (Н). ув 95400

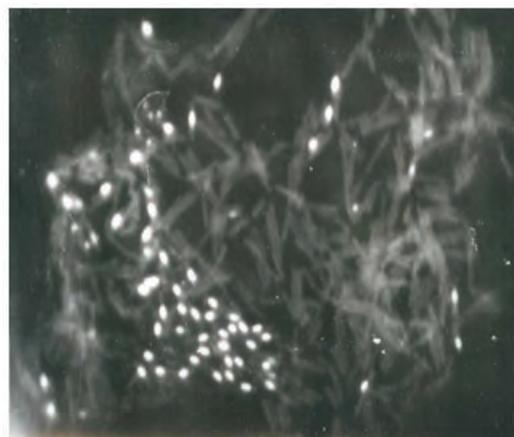


Рис. 2. Споры *Bac. anthracis* (штамм СТИ-1) МЛ-2, МФН-10. объектив 95x1,25. окуляр фото 012

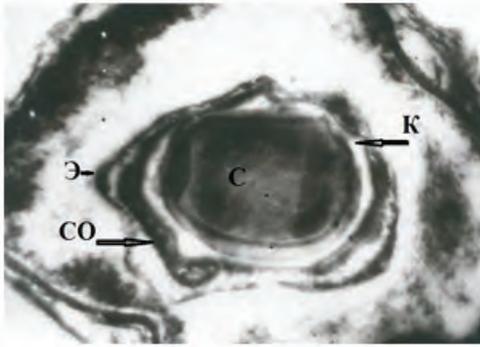


Рис. 3. Ультратонкий срез споры штамма № 2222 культуры 10-ти суточного возраста. Отчетливо видны все структуры зрелой споры: экзоспориум (Э), споровая оболочка (СО), кортекс (К), внутри которого располагается спороплазма (С). Ув. 180000

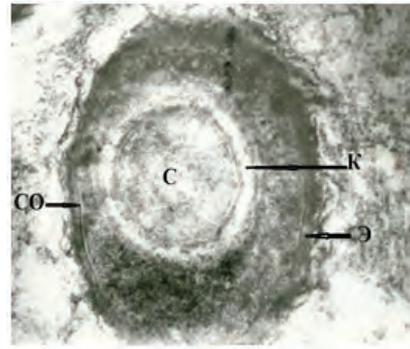


Рис. 4. Ультратонкий срез споры Bac. Anthracis штамм № 2222, культуры 10-ти суточного возраста. Отчетливо видны все структуры зрелой споры: экзоспориум (Э), споровая оболочка (СО), кортекс (К), внутри которого располагается спороплазма (С). У экзоспориума хорошо просматривается ворсинчатое покрытие (В). Ув. 180000

Выводы и перспективы дальнейших исследований. 1. При электронномикроскопическом исследовании ультратонких срезов спор бациллы антракса разных штаммов установлено, что все они имели сложную внутреннюю структуру, состоящую из спороплазмы, покрытой мембраной, коры, внешней и внутренней споровых оболочек, экзоспориума с ворсинчатым покрытием. Существенных различий в ультратонком строении зрелых спор исследуемых штаммов при данном разрешении электронного микроскопа не обнаружено. Полученные сведения о сложном строении спор бациллы антракса следует учитывать при выборе дезинфектантов для проведения оздоровительных мероприятий.

2. Важнейшей задачей в профилактике сибирской язвы должно быть выявление, учет, паспортизация и обеспечение надлежащего состояния скотомогильников – природных резервуаров спор бациллы антракса, скотопрогонных маршрутов, неблагополучных пунктов, пастбищ, помещений, контроль за проведением агротехнических и мелиоративных мероприятий, направленных на оздоровление неблагополучных территорий.

3. Плановая иммунизация сельскохозяйственных животных в неблагополучных пунктах остается на неопределенное время основным и необходимым мероприятием в профилактике сибирской язвы.

4. Контроль за соблюдением ветеринарно-санитарных правил при заготовке, хранении, транспортировке и обработке сырья.

5. Своевременная диагностика сибирской язвы, изоляция и лечение больных животных, обезвреживание трупов павших животных, текущая и заключительная дезинфекция в очаге.

6. Ветеринарно-санитарная просветительная работа среди населения.

Список литературы

1. Бакулов И.А., Гаврилов В.А. Сибирская язва животных и людей // Ветеринарная медицина, сентябрь, 2000.
2. Бакулов И.А., Гаврилов В.А., Селивестров В.В. Сибирская язва (антракт), Владимир, 2001.
3. Бакулов В.А. Оценка эффективности 10 –ти летнего применения вакцины против сибирской язвы животных из штамма 55 – ВНИИВВ и М. // Ветеринария № 8, 1994.
4. Бусол В. Епізоотичний моніторинг / Бусол В, Постой В, Блажко А.// Ветеринарна медицина України, № 3, 2002.
5. Головко А.Н. Современные подходы к конструированию бактериальных вакцин. Вісник аграрної науки, 11, 1998. – С. 33 – 36.
6. Головко А.М. Подходы к программе по биобезопасности и предупреждению биорисков в Украине. Ветеринарна медицина. Мівідомчий тематичний науковий збірник 99, 2014р. с.56 - 60.
7. Ипатенко Н.Г. Профилактика сибирской язвы в России / Ипатенко Н.Г., Бахтаров С.И., Филиппов Н.В. // Ветеринария № 9., 2000 г.
8. Лобзин Ю.В., Волжанин В.М., Захаренко С.М. Сибирская язва. Болезни и возбудители. Санкт-Петербург КМАХ – 2002, том 4, №12.
9. Микшис Н.И. Конструирование рекомбинантных штаммов *Bacillus anthracis* для создания нового поколения высокоэффективных сибиреязвенных вакцин / Микшис Н.И., Корсакова А. Ю., Кудрявцева О.М., и др // Методические документы и отчеты по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации. - Саратов, 2005.- С. 12.
10. Микшис Н.И. Патент РФ на изобретение №2321629 – Аспорогенный рекомбинантный штамм *B. anthracis* 55 ТПА-1 Spore (pUB110PA-1) - продуцент протективного антигена сибиреязвенного микроба / Микшис Н.И., Попов Ю.А., Шулепов Д.В. // Бюллетень №10 от 10.04.2008 г. 41 с.
11. Пилинов Е.В., Кожухов В.В., Строчков Ю.И. Создание вакцин против сибирской язвы. Режим доступа: <http://bio.1septembr.ru/2002/02/06.htm>. D.1-7.
12. Сибирская язва как оружие // Газета «Время» - сентябрь, 6. – 2001. 13с.
13. Шулепов Д.В. Получение высокоочищенного препарата протективного антигена из рекомбинантного аспорогенного штамма *Bacillus anthracis* / Шулепов Д.В., Микшис Н.И., Кудрявцева О.М., и др.// Международные медико-санитарные правила и реализация глобальной стратегии борьбы с инфекционными болезнями в государствах-участниках СНГ: Материалы Межгосударственной научно-практической конференции. - Саратов, 2007. - С. 320-321.

14. Henry L. Inhalational Anthrax Threat, Clinical Presentation and Treatment J. Acad Nurse Pract, 2001; 13:164 – 8.
15. Fox J. Bioterrorism microbiology key to dealing with threats ASM News 1998; 64:225 – 7. 20 Singh V, Khanna H, et al. Dominant negativemutant of Bacillus anthracis protective antigen inhibits anthracis toxin action in vivo Biol. Chem 2001;

MAIN DIRECTIONS OF IMPROVEMENT OF BIOSAFETY AND BIOSECURITY UNDER ANTHRAX

Belokonov I. I., Grinchenko D. N.

Kharkiv State Zooveterinary Academy, Kharkov, Ukraine

Stegniy B. T.

*National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine»,
Kharkov, Ukraine, e-mail: admin@vet.kharkov.ua*

Anthrax – an acute infectious disease of domestic and wild animals, including humans, occurring phenomena of septicaemia or formation of anthrax known to man since ancient times. The settlement, in which ever had any disease of animals or humans with anthrax, traditionally considered to be disadvantaged.

The presence on the territories of many countries of stationary unfavorable by anthrax foci, as well as many old burial sites - natural reservoirs of the Bacillus of anthrax and the possibility of erosion during floods or destruction in the process of fighting, significantly increases the risk of outbreaks of anthrax infection.

You need to remember about the tragic experience and the possibility of using the anthrax microbe as a biological agent for terrorist acts and development of weapons of mass destruction.

Be aware that vaccines only prevent infestation of animals, but do not eliminate the constant threat of disease, as the causative agent of anthrax can decades found in soil and other environment objects in the form of spores in places where they died or were buried animals sick with anthrax. These places are not always known and marked on the ground. Soil anthrax foci difficult to neutralize and therefore there is always the threat of infection of animals.

The main biological properties of spores of Bacillus anthrax, characterized by their uniqueness, which causes increased interest in the investigation of their submicroscopic structure involving electron microscopy, high resolution.

Materials and methods. As object of research were used the spores of the anthrax vaccine strains STI-1, No. 55, 2 nd vaccine of Cankovskogo and conventional methods of fluorescent, phase-contrast and electron microscopy.

The results of the research. The structure of spores of anthrax pathogen was investigated in cultures older than 3 days. During this period, the disputes had all the signs of Mature cells and was characterized by the presence of optically dense cytoplasm (sporoplasm) having the most homogeneous structure. Only in some cases were able to detect patterns characteristic of vegetative cells (nucleus, membrane structure, ribosome). Sporoplasm the outside was surrounded by a membrane (sheath) with a thickness of about 15-20 nm, which places two layers were detected. On the membrane surface was occupied by a massive layer of the cortex (bark) of a thickness of 100-120 nm in the form of osmophobia some component or in the form of a layered structure from others. Outside the cortex of the spore was covered with a shell thickness of 30-35 nm composed of two layers.

Around the circumference of the outer layer of the spore membrane were arranged in the form of a thin membrane with thickness of 15-20 nm Akseoris, on the surface of which there was a network of fibers, in some cases resembling the spikes.

Conclusions and prospects for further research: 1. At electronic-microscopic study of ultrathin sections of spores of anthrax bacilli of different strains found that they all had a complex internal structure, comprising of spiroplasma, covered with membrane, cortex, outer and inner spore membranes, azospirillum with villous coating.

Significant differences in the ultra structure of the Mature spores of the studied strains at a given resolution of an electronic microscope is not detected. Received information about the complex structure of spores of Bacillus anthrax should be considered when choosing disinfectants for invigoration events.

2. The most important task in the prevention of anthrax should be the identification, recording, certification and proper state of burial sites – natural reservoirs of spores of Bacillus anthrax, cattle routes, affected areas, pasture, premises, control over the conduct of agrotechnical and reclamation measures aimed at improving disadvantaged areas.

3. Routine immunization of farm animals in disadvantaged points remain indefinitely the primary and necessary event in the prevention of anthrax.

4. Control over observance of veterinary-sanitary rules for procurement, storage, transportation and processing of raw materials.

5. Timely diagnosis of anthrax, and isolation and treatment of sick animals, disposal of carcasses of dead animals, current and final disinfection in the hearth.

6. Veterinary and sanitary educational robot in the population.

Keywords: anthrax, Biosafety, biosecurity, spores, electron microscopy