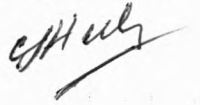


На правах рукописи



ЖАРНИКОВА
Татьяна Владимировна

**УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ
ИНДИКАЦИИ *FRANCISELLA TULARENSIS*
И *LEPTOSPIRA INTERROGANS*
С ПРИМЕНЕНИЕМ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ
СИСТЕМ**

03.00.07 – микробиология

03.00.23 – биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Ставрополь – 2009

Работа выполнена в ФГУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Научный руководитель: заслуженный деятель науки РФ,
доктор медицинских наук, профессор
Ефременко Виталий Иванович;

доктор медицинских наук
Антоненко Анатолий Дмитриевич.

Официальные оппоненты: заслуженный деятель науки РФ,
доктор биологических наук, профессор
Дмитриев Анатолий Федорович;

доктор биологических наук
Селионова Марина Ивановна.

Ведущая организация: ФГУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора.

Защита состоится « ___ » _____ 2009 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета ДМ 212.256.09 при Ставропольском государственном университете по адресу: 355009, г. Ставрополь, ул. Пушкина, 1, корп. 2, аудитория 506.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ставропольского государственного университета.

Автореферат разослан « ___ » _____ 2009 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Ржепаковский И.В.



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Эпидемиологическая обстановка по туляремии и лептоспирозу продолжает оставаться неблагоприятной, что обусловлено наличием во многих субъектах Российской Федерации природных очагов данных инфекций (МУ 3.1.1128—02, МУ 3.1.2007-05), а также формированием новых. Сохранение природных очагов туляремии, циркуляция возбудителя среди домашних животных, а также вероятность применения *Francisella tularensis* при биотеррористических актах определяют актуальность исследований, посвященных совершенствованию диагностики данного заболевания. Сохраняющаяся активность очагов лептоспирозов в ряде регионов России, включая Ставропольский край, требует постоянного внимания со стороны санитарно-эпидемиологических служб и лечебно-профилактических учреждений (Ковалев Н.Г. с соавт., 2006). В связи с этим, возникает необходимость применения современных информационных, диагностических, профилактических, производственных технологий, обеспечивающих профилактику заболеваний (Онищенко Г.Г., 2007).

Существуют разнообразные методы индикации возбудителей указанных инфекций (бактериологические, биологические, иммунологические и т.д.), имеющие свои достоинства и недостатки. Перспективным направлением является разработка иммунодиагностических тестов, характеризующихся экспрессностью, простотой технического исполнения и учета результатов в сочетании с высокой специфичностью и чувствительностью (Сырова Н.А., Девдариани З.Л., Голова А.Б., 2007). Среди способов индикации возбудителей инфекционных заболеваний особое место занимают иммуносорбционные, в основе которых лежит принцип аффинности, базирующийся на специфическом связывании антигенов с комплементарными антителами. Новым этапом совершенствования общепринятых методов диагностики является разработка, освоение производства диагностических препаратов на основе магноиммуносорбентов (Саяпина Л.В. с соавт., 2007).

Среди лептоспирозной и туляреминой инфекций имеются общие пути заражения людей и источники инфицирования объектов внешней среды. В связи с этим, особое значение приобретает индикация возбудителей лептоспироза и туляремии в сочетанных очагах. Одним из общих путей передачи инфекции является водный. «Купальные» вспышки возникают в результате нарушений санитарно - гигиенических правил при размещении животноводческих ферм и летних лагерей вблизи различных водоисточников, водопоя из открытых водоемов сельскохозяйственных животных, выделяющих патогены, заражением воды трупами грызунов, инфицированных возбудителями туляремии и лептоспироза. Традиционными методами выявить данные возбудители сложно, так как их концентрация в водоеме ниже порога чувствительности известных методов диагностики. В связи с этим, необходим постоянный мониторинг за наличием данных патогенов в объектах внешней среды с использованием современных экспрессных методов индикации, обладающих высокой чувствительностью.

ВЫВОДЫ

1. Эффективный микробиологический мониторинг объектов внешней среды и материала от животных на эпидемичной территории на наличие *F. tularensis* и *L. interrogans* в реакции иммунофлуоресценции возможен при использовании разработанных иммунофлуоресцирующих препаратов, полученных с применением аффинных иммуносорбентов для одномоментной хроматографической очистки иммуноглобулинов флуоресцирующих от несвязавшегося красителя и

гетерологических антител, которые позволяют получить высокоактивные (1:32-1:128), специфические антитела за короткое время (1 ч.).

2. Экспресс-анализ *F. tularensis* и *L. interrogans* в реакциях суспензионной агглютинации с использованием в качестве твердой фазы иммуносорбентов на основе кремнезёмно-флуоресцентной матрицы с антителами против эпидемически значимых штаммов возбудителей лептоспироза и туляремии увеличивает вероятность достоверной диагностики, экономит время (учет через 1-3 мин., против 2 ч. при постановке микрометода РНГА), расход дорогостоящих биопрепаратов и создаёт неоспоримые удобства при выполнении лабораторных исследований (возможность проведения и завершения анализов без выделения культуры).

3. Оптимизированы методы экспресс-диагностики возбудителя туляремии в ИФА путем применения разработанных тест-систем диагностических магнимоносорбентных (на основе сертифицированных реактивов) с чувствительностью 100 - 1000 м.к./мл (акт межлабораторных испытаний от 24.12.08 г.).

4. Для одновременного выявления возбудителей туляремии и лептоспироза в пробах внешней среды получены диагностические тест-системы магнимоносорбентные бивалентные (туляремийные, лептоспирозные) для ИФА, обладающие высокой чувствительностью (10^3 м.к./мл), специфичностью (отсутствие перекрестных реакций с гетерологическими штаммами) и непродолжительным сроком проведения анализа (1,0 - 1,5 ч.). Имобилизация на разработанном сорбенте туляремийных и лептоспирозных иммуноглобулинов обеспечивает сохранение их исходной активности, увеличивает в 4 раза (срок наблюдения) стабильность и срок годности по сравнению с иммобилизованными полистироловыми планшетами.

5. При использовании бивалентных магнимоносорбентов в модельных опытах на воде (3000 мл), контаминированной *F. tularensis* и *L. interrogans*, получены положительные результаты при наличии в объеме пробы 10^2 - 10^3 м.к. и выше. Методами ИФА с использованием сенсibilизированных полистироловых планшет, РНГА, РАЛ выявить возбудителей туляремии и лептоспироза в данном объекте не удалось из-за низкой концентрации патогенов (100 м.к. в 3000 мл воды).

6. Установлена высокая диагностическая ценность при исследовании полевого материала на наличие возбудителей туляремии и лептоспироза разработанных препаратов и методов. В ИФА с бивалентным магнимоносорбентом положительные результаты по выявлению возбудителя туляремии (внутренние органы грызунов) получены в 17,5 % исследуемых пробах, что в 3,5 раза больше, чем в РНГА (5 %), в 2,3 раза больше, чем в традиционном ИФА (7,5 %). Из этих же проб получено 5 % положительных результатов на наличие возбудителя лептоспироза, который не обнаруживался другими методами.

7. При выявлении лептоспир в воде открытых водоемов в период водной вспышки лептоспироза у людей эффективным (60 % положительных проб на наличие лептоспир и 7 % положительных проб на присутствие возбудителя туляремии) является ИФА, где в качестве твердой

фазы использованы сконструированные бивалентные МИС, значительно повышающие чувствительность анализа. Традиционными методами обнаружить возбудителей инфекций в таких объектах крайне сложно, поскольку концентрация патогенов в водоеме ниже порога чувствительности известных методов диагностики.