

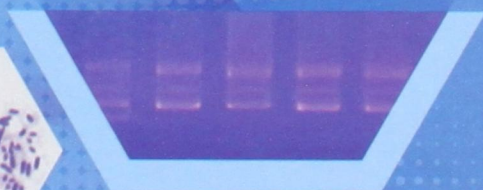
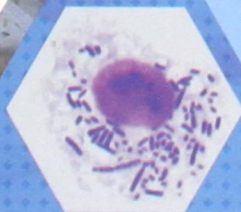
21-4778

НА ДОМ НЕ ВЫДАЕТСЯ

МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

Под редакцией
академика РАН И.А.Дятлова

877ho-12



Оболенск
2021

**Маринин Л.И., Дятлов И.А., Мокриевич А.Н.,
Шишкова Н.А., Тимофеев В.С., Миронова Р.И.,
Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Кравченко Т.Б.,
Комбарова Т.И., Тюрин Е.А., Чекан Л.В.**

**МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ
БИОЛОГИЧЕСКИХ
И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ
СВОЙСТВ ВОЗБУДИТЕЛЯ
СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ**

Учебно-методическое пособие

*Под редакцией
академика РАН, доктора медицинских наук,
профессора И.А.Дятлова*

**Оболенск
2021**

УДК 616.9:579.852.11(075)+619:616.9:579.852.11(075)
ББК 55.146я7+48.73я7
М54

**М54 Методы изучения биологических и молекулярно-генетических свойств возбудителя сибирской язвы: учебно-методическое пособие / Маринин Л.И., Дятлов И.А., Мокриевич А.Н. [и др.]; под общ. ред. И.А.Дятлова. – Москва: Издательство «Династия», 2021. – 240 с.: ил.
ISBN 978-5-98125-122-1**

В учебно-методическом пособии на основании сведений литературы и многолетних собственных исследований авторов приведено описание методов оценки биологических и молекулярно-генетических свойств возбудителя сибирской язвы. Наряду с характеристикой свойств возбудителя подробно изложены различные методы исследования культурально-морфологических, биологических, молекулярно-генетических свойств, методические приемы работ с экспериментальными животными, методы поддержания, хранения, приготовления споровых сибиреязвенных культур, а также правила обеспечения безопасности работ с возбудителем сибирской язвы.

Пособие может быть использовано практическими специалистами медицинского и ветеринарного профилей, научными сотрудниками, преподавателями, аспирантами и студентами при изучении и оценке биологических и молекулярно-генетических свойств возбудителя сибирской язвы.

Книга издана при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках гранта в форме субсидии на создание и развитие «Центра геномных исследований мирового уровня по обеспечению биологической безопасности и технологической независимости в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий», соглашение №075-15-2019-1671.

**УДК 616.9:579.852.11(075)+619:616.9:579.852.11(075)
ББК 55.146я7+48.73я7**

ОГЛАВЛЕНИЕ

СОКРАЩЕНИЯ	6
ВВЕДЕНИЕ	8
ГЛАВА 1	
Методы определения биологических свойств возбудителя сибирской язвы	9
1.1. Общая характеристика возбудителя сибирской язвы	9
1.2. Историческая справка открытия возбудителя сибирской язвы	10
1.3. Исследования морфологических свойств возбудителя сибирской язвы	12
1.3.1. Общие правила работы с микроскопом.....	12
1.3.2. Определение морфологии вегетативных микробных клеток.....	14
1.3.3. Определение подвижности микробных клеток.....	20
1.3.4. Определение морфологии спор.....	21
1.4. Культивирование возбудителя сибирской язвы.....	27
1.4.1. Оценка характера роста на агаровой среде	28
1.4.2. Питательная среда для выделения и дифференциации <i>B. anthracis</i>	31
1.4.3. Оценка характера роста в жидких питательных средах.....	35
1.4.4. Выявление дополнительных питательных потребностей сибирезвенного микроба.....	38
1.5. Ферментативная активность возбудителя сибирской язвы.....	38
1.6. Факторы патогенности возбудителя сибирской язвы.....	51
1.6.1. Определение капсулообразования	52
1.6.1.1. <i>Определение капсулообразования in vitro</i>	52
1.6.1.2. <i>Определение капсулообразования in vivo</i>	58
1.6.2. Получение капсульного вещества возбудителя сибирской язвы.....	61
1.6.3. Оценка токсинообразования	63
1.6.3.1. <i>Определение токсинообразования in vitro</i>	63
1.6.3.2. <i>Определение токсинообразования in vivo</i>	66
1.6.4. Определение вирулентности <i>B. anthracis</i> по продукции капсулы и токсина <i>in vitro</i>	67
1.7. Антигенная структура	69
1.7.1. Изучение антигенного состава <i>B. anthracis</i>	69
1.7.2. Получение антигенов из вегетативных клеток.....	73
1.7.3. Приготовление споровых антигенов	75
1.7.4. Получение специфических сывороток к споровым антигенам <i>B. anthracis</i>	76
1.7.5. Получение специфических сывороток к антигенам вегетативных клеток <i>B. anthracis</i>	77
1.7.6. Получение укороченных противосибирезвенных антител (F(ab)2-фрагмента).....	78

1.8. Оценка чувствительности <i>B. anthracis</i> к специфическому сибиреязвенному бактериофагу	80
1.8.1. Определение чувствительности <i>B. anthracis</i> к бактериофагам	83
1.8.2. Метод определения популяционного состава штаммов по резистентности к сибиреязвенным бактериофагам	86
1.8.3. Реакция нарастания титра фага	87
1.9. Чувствительность <i>B. anthracis</i> к антибиотикам.....	88
1.9.1. Определение чувствительности к антибиотикам	89
1.9.2. Оценка лечебной эффективности антибиотиков.....	97
1.9.3. Экспресс-методика определения лечебной эффективности антибиотиков.....	98
1.10. Критерии типового высокопатогенного штамма возбудителя сибирской язвы.....	101

ГЛАВА 2

Молекулярно-генетические методы исследования	107
2.1. Использование полимеразной цепной реакции для обнаружения возбудителя сибирской язвы.....	107
2.1.1. Отбор проб для исследования методом ПЦР	108
2.1.2. Подготовка материала к исследованию.....	109
2.1.3. Выделение ДНК из материала, подозрительного на наличие возбудителя сибирской язвы	110
2.1.4. Проведение полимеразной цепной реакции.....	112
2.2. ПЦР-индикация и дифференциация <i>B. anthracis</i> от близкородственных бактерий	114
2.3. Генотипирование	121
2.3.1. SNP-типирование	121
2.3.2. MLVA-типирование	125
2.3.3. Мультилокусное сиквенс-типирование	131
2.3.4. Полногеномное секвенирование	133
2.4. Идентификация штаммов <i>B. anthracis</i> методом MALDI-TOF масс-спектрометрии.....	134

ГЛАВА 3

Работа с экспериментальными животными	136
3.1. Общие правила работы в виварии	136
3.2. Содержание экспериментальных животных.....	140
3.3. Манипуляции с лабораторными животными.....	143
3.4. Взятие крови у лабораторных животных.....	144
3.5. Заражение животных. Определение величины LD ₅₀	147
3.6. Оценка специфичности поражения экспериментальных животных	154
3.7. Оценка иммуногенных свойств сибиреязвенных вакцинных штаммов и препаратов	156
3.8. Оценка безвредности вакцинных штаммов и препаратов.....	159
3.9. Определение превентивных (защитных) свойств сывороток крови.....	163

3.10. Определение специфической активности сибирезвеного иммуноглобулина	164
3.11. Оценка токсин-нейтрализующей активности моноклональных антител	166

ГЛАВА 4

Методы поддержания штаммов возбудителя сибирской язвы	169
4.1. Методы хранения культур штаммов возбудителя сибирской язвы	169
4.2. Получение и характеристика свойств споровой культуры <i>B. anthracis</i>	173
4.3. Лиофильное высушивание споровых культур	176
4.4. Метод контактного обезвоживания споровых культур	177
4.5. Определение посторонней микрофлоры	178
4.6. Определение общей концентрации микробных клеток (спор)	179
4.7. Определение процентного содержания спор	180
4.8. Определение количества живых спор	182
4.9. Определение терморезистентности спор	186
4.10. Схема получения и характеристика эталонной споровой культуры	187

ГЛАВА 5

Обеспечение безопасности работ с возбудителем сибирской язвы	190
5.1. Общие положения и требования биологической безопасности	190
5.2. Правила работы и поведения в лаборатории	195
5.3. Предупреждение аварийных ситуаций. Аварии и ликвидация последствий	200
5.4. Боксы биологической безопасности	203
5.4.1. Общая характеристика боксов биологической безопасности	203
5.4.2. Оценка работоспособности боксов биологической безопасности	207
5.4.3. Правила работы в боксах биобезопасности	209
5.5. Защитная одежда персонала, работающего с возбудителем сибирской язвы	211
5.6. Определение концентрации перекиси водорода	215
5.7. Контроль обсемененности рабочих помещений и оборудования	217
5.8. Инактивация возбудителя сибирской язвы в культурах и различных материалах	218
5.9. Контроль стерильности препаратов ДНК	220

ПРИЛОЖЕНИЯ	221
1. Подготовка лабораторной посуды	221
2. Питательные среды для оценки свойств возбудителя сибирской язвы	221
3. Приготовление рабочих растворов	224

ЛИТЕРАТУРА	226
-------------------------	------------