სსიპ-სოხუმის სახელმწიფო უნივერსიტეტი

საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა და ჯანდაცვის ფაკულტეტი

ხელნაწერის უფლებით

ლალი ღვალაძე

იმუნოდიაგნოსტიკის ტესტ-სისტემის გაუმჯობესება ჯილეხის აღმძვრელის სწრაფი ინდიკაციისათვის

ბიოლოგიის დოქტორის აკადემიური ხარისხის
მოსაპოვებლად წარდგენილი

დ ი ს ე რ ტ ა ც ი ი ს მ ა ც ნ ე

თ ბ ი ლ ი ს ი
2016

სადისერტაციო თემით გათვალისწინებული სამუშაოები ჩატარდა 2000-2011 წლებში საქართველოს აგრარული უნივერსიტეტის ინფექციურ და ინვაზიურ სნეულებათა დეპარტამენტში, თბილისის გ. ელიავას სახელობის ბაქტერიოფაგიის, მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტის იმუნოლოგიის ლაბორატორიასა და შპს „იმუნოგენში“.

სამეცნიერო ხელმძღვანელები:

ზაურ ლომთათიძე,
ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი, სოხუმის სახელმწიფო უნივერსიტეტის პროფესორი

სერგო რიგვავა,
ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი, პროფესორი, მედიკო–ბიოლოგიური აკადემიის აკადემიკოსი.

ექსპერტები:

ნონა მიქაია,
ბიოლოგიის აკადემიური დოქტორი, სსიპ-სოხუმის სახელმწიფო უნივერსიტეტის ასოცირებული პროფესორი.

მზია წიკლაური,
აკადემიკოს ო. ღუდუშაურის სახ. ეროვნული სამედიცინო ცენტრის იმუნოლოგი, ბიოლოგიის აკადემიური დოქტორი, პროფესორი.

ოფიციალური რეცენზენტები:

ილია გოროზია,
ბიოლოგიის აკადემიური დოქტორი, სსიპ-სოხუმის სახელმწიფო უნივერსიტეტის ასოცირებული პროფესორი.

შოთა ცანავა,
მედიცინის აკადემიური დოქტორი, ივ.ჯავახიშვილის უნივერსიტეტის საზოგადოებრივი ჯანდაცვის კათედრის ასოცირებული პროფესორი.

დისერტაციის დაცვა შედგება 2016 წლის 25 ნოემბერს, 14 საათზე, სსიპ–სოხუმის სახელმწიფო უნივერსიტეტის საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა და ჯანდაცვის ფაკულტეტის სადისერტაციო კომისიის სხდომაზე.
მისამართი: ანა პოლიტკოვსკაიას ქ. #9. საპრეზენტაციო ოთახი.

სადისერტაციო საბჭოს მდივანი
ბიოლოგიის აკადემიური დოქტორი,
სსიპ–სოხუმის სახელმწიფო უნივერსიტეტის
ასოცირებული პროფესორი ნონა მიქაია

ნაშრომის ზოგადი დახასიათება

ჯილეხი კვლავ რჩება მსოფლიოს მასშტაბით აქტუალურ პრობლემად. ჯილეხისადმი დიდ ინტერესს განაპირობებს ჯანდაცვა, სოციალურ-ეკონომიკური მნიშვნელობა და საკითხების ნუსხა, რომლეიც ეხება აღმძვრელის ბუნებას, პათოგენეზს, დიაგნოსტიკას, სამკურნალო-პროფილაქტიკურ საშუალებებს და სხვა.

ჯილეხის აღმძვრელის მიერ გარემოში სპორის წარმოქმნა და ნიადაგში ათეული წლების განმავლობაში სიცოცხლისუნარიანობის შენარჩუნება, სპოროვანი ფორმიდან ვეგეტატურში და პირუკუ გადასვლა, მუდმივად ქმნის დაავადების აფეთქების საშიშროებას, მნიშვნელოვნად აფერხებს აღმძვრელის, როგორც ბიოლოგიური ობიექტის, აღმოფხვრას.

ჯილეხისადმი განსაკუთრებული ყურადღება გამოწვეულია მისი ბიოლოგიურ იარაღად გამოყენების შესაძლებლობლობით.

2001-2015 წლებში ჯილეხით ადამიანთა დაავადების 812 შემთხვევიდან, დაავადების მაჩვენებელი განსაკუთრებით მაღალია 2012-20013 წლებში (142-143 შემთხვევა), ხოლო 2002-2005 წლებში შემთხვევათა მინიმალური რაოდენობაა აღრიცხული (15-19 შემთხვევა). ხოლო ჯილეხით დაავადებული ცხოველების რიცხვმა 2000-2011 წწ. შეადგინა 108, ყველა ლეტალური გამოსავლით – 99 სული მსხვილფეხა პირუტყვი, 7 ცხვარი და თხა, 1 ცხენი და 1 ღორი.

ახლადაღმოცენებული კერების სიმრავლე და დაავადების გავრცელების ინტენსივობა მოითხოვს სწრაფი, მარტივი და ეკონომიკურად ხელმისაწვდომი კვლევების ჩატარების აუცილებლობას. ჯილეხის სადიაგნოსტიკო თანამედროვე მეთოდები ძვირადღირებულია და მისი რეტროსპექტული გამოკვლევებისათვის გამოყენება საკმაოდ დიდ ხარჯებთანაა დაკავშირებული. ამიტომ, დღეს უაღრესად აქტუალურია მაღალმგრძნობიარე, სპეციფიკური და ეკონომიკურად გამართლებული სადიაგნოსტიკო ტესტ–სისტემის შემუშავება.

კვლევის მიზანი და ამოცანები

ნაშრომის მიზანს წარმოადგენს ჯილეხის დაავადების აღმოცენების და ინფექციის გავრცელების აქტუალობიდან გამომდინარე, წყლებში, ნიადაგში, ტყავ–ბეწვეულში და სხვა ობიექტებში ჯილეხის აღმძვრელის სწრაფი ინდიკაციისათვის გაუმჯობესებული სადიაგნოსტიკო სეროლოგიური ტესტ–სისტემის შემუშავება, გამოცდა და დანერგვა.

აღნიშნულის გათვალისწინებით, კვლევები მოიცავდა შემდეგი ამოცანების გადაწყვეტას:

1. საქართველოში 2000-2011 წწ ჯილეხის ეპიდემიოლოგიური სიტუაციის შესწავლას;
2. ჯილეხის სავაქცინე შტამების („სტი", 34F_2) და ბაცილების გვარში შემავალი სახეობების (Bac. cereus, Bac. megatherium, Bac. mesentericus, Bac. subtilis, Bac. mycoides) სტაბილურობის დასადგენად ძირითად ნიშან-თვისებების შესწავლას.
3. გაუმჯობესებული სეროლოგიური ტესტ-სისტემის შემუშავებას და მის გამოყენებას პასიური ჰემაგლუტინაციის რეაქციაში;
4. ჯილეხის სადიაგნოსტოკო გაუმჯობესებული ტესტ-სისტემის მგრძნობელობის და სპეციფიკურობის შესწავლას;
5. ,,სტი'' (სანიტარიულ-ტექნიკური ინსტიტუტი) ვაქცინით და ბაცილების გვარის სახეობებით ხელოვნურად კონტამინირებული მდინართა წყლების, ნიადაგისა და ტყავ-ნედლეულის სინჯების გამოკვლევას.
6. გაუმჯობესებული ტესტ–სისტემის გამოყენებას ხელოვნურად დაინფიცირებულ თეთრ თაგვებზე;
7. პასიური ჰემაგლუტინაციის რეაქციის (პჰრ) გამოყენებას, მდინარეთა წყლებში, ნიადაგში და ტყავ-ნედლეულში Bac. anthracis სწრაფი ინდიკაციისათვის.

ნაშრომის მეცნიერული სიახლე

– აღწერილია 2000–2011 წწ. საქართველოში ჯილეხის ახლად აღმოცენებული არაკეთილსაიმედო პუნქტები და ამის მიხედვით შედგენილია რუკა.
– მდინარეთა წყლებში, ნიადაგში და ტყავ-ბეწვეულში ჯილეხის ექსპრეს დიაგნოსტიკისათვის შემუშავებულია გაუმჯობესებული სეროლოგიური ტესტ-სისტემა;
– პასიური ჰემაგლუტინაციის რეაქცია შემოთავაზებული ჯილეხის ტესტ–სისტემის გამოყენებით, თავისი მგრძნობელობით აღემატება აპრობირებულ დიაგნოსტიკისათვის დანერგილ პრეციპიტაციის რეაქციას და პერსპექტიულია მედიცინასა და ვეტერინარიაში სამეცნიერო და პრაქტიკულ მიზნებისთვის გამოსაყენებლად.
– ტესტ–სისტემა – ჯილეხის სპეციფიკური და მაღალმგრძნობიარე ერითროციტარული იმუნოგლობულინური (ანტისხეულური) დიაგნოს-ტიკუმია, რომელიც პასიური ჰემაგლუტინაციის რეაქციაში დროის მცირე მონაკვეთში (1,5–3 საათი) Bac. anthracis ინდიკაციის ($2,0x10^3$ – $3,0x10^3$ 20-30 ათასი) ერთეული მიკრობის აღმოჩენის საშუალებას იძლევა;

ნაშრომის პრაქტიკული მნიშვნელობა

1. შესწავლილია 2000-2011 წწ. საქართველოში სასოფლო-სამეურნეო ცხოველებსა და ადამიანებში ჯილეხის გავრცელების დინამიკა;

2. შედგენილია საქართველოში ჯილეხის ახლადაღმოცენებული არაკეთილსაიმედო კერების რუკა-სქემა, რაც დახმარებას გაუწევს ჯილეხის პრობლემით დაინტერესებულ ჯანდაცვისა და ვეტერინარიის სპეციალისტებს დაავადების სალიკვიდაციო ღონისძიებების დროულ და სწრაფად გატარებაში.

3. შემუშავებული, სპეციფიკური და მაღალმგრძნობიარე ტესტ–სისტემა საშუალებას იძლევა დროის მცირე მონაკვეთში (1,5–3 სთ) ჯილეხზე გამოვიკვლიოთ პათოლოგიური მასალა და გარემოს ობიექტები – ნიადაგი, წყალი და ტყავ-ნედლეული. ტესტ-სისტემა დახმარებას განსაკუთრებით გაუწევს ვეტერინარ სპეციალისტებს, რათა მაქსიმალური სიზუსტით აღირიცხოს ტყავ–ნედლეულში ჯილეხის აღმძვრელის არსებობა და უზრუნველყოს ადამიანებისა და ცხოველების უსაფრთხოება.

4. შემუშავებული ტესტ–სისტემით შესაძლებელია ნიადაგში ჯილეხის გავრცელების გამოკვლევა, რაც მნიშვნელოვანია სატრანზიტო კომუნიკაციების, სამელიორაციო, სამშენებლო და სასოფლო–სამეურნეო მიწების ათვისებისას უსაფრთხობის დასადგენად.

დისერტაციის სტრუქტურა და მოცულობა

დისერტაცია წარმოდგენილია ნაბეჭდი ტექსტის 134 გვერდზე. შეიცავს შესავალს, ლიტერატურის მიმოხილვას, გამოყენებული მასალებისა და მეთოდების აღწერას, საკუთარ გამოკვლევებს, მიღებული შედეგების განხილვას, დასკვნებს, პრაქტიკულ წინადადებებს, ლიტერატურის სიას. ნაშრომს თან ერთვის ჯილეხის ახლადაღმოცენებული კერების ატლასი და ინსტრუქცია „ჯილეხის გაუმჯობესებულ ტესტ- სისტემის შემუშავება“ (დამტკიცებულია შპს „იმუნოგენის“ სამეცნიერო საბჭოს მიერ). ნაშრომი ილუსტრირებულია 18 ცხრილით, 4 დიაგრამით, რუკით, 2 სქემით. ლიტერატურის სია მოიცავს 155 დასახელებას.

კვლევის ობიექტები და მეთოდები

გამოსაკვლევი მასალა

ცდების ჩატარების პროცესში გამოვიკვლიეთ 191 ნიადაგის, 19 მდინარის და 130 ტყავის ნიმუში და მიკროორგანიზმთა კულტურები: Bac. cereus, Bac. subtilis, Bac. megatherium, Bac.anthracoides, Bac. mycoides, Bac. mesenterius

ჯილეხის სავაქცინე ,,სტი'' და $34F_2$; „სტი“ და $34F_2$ ვაქცინების უვნებლობის დასადგენად ცდებში გამოვიყენეთ 18–20 გ. ცოცხალი მასის მქონე 10 თეთრი თაგვი.

საკვები არეები

ბაქტერიოლგიური გამოკვლევებისათვის გამოვიყენეთ: სოიოს ბულიონი (pH 7.2-7.4), სოიოს აგარი (pH 7.2-7.4), ბრეინჰარტის ბულიონი (pH 7.2-7.4), ბრეინჰარტის აგარი (pH 7.2-7.4), ნახევრადთხევადი (0,4%-იანი) აგარი, სისხლიანი აგარი, რძე, ხორც-პეპტონიანი ჟელატინა, შაქრების ფერადი რიგი (გლუკოზა, ფრუქტოზა, რამნოზა, საქაროზა და დექსტრინი).

საპრეციპიტაციო შრატები

ჯილეხის საპრეციპიტაციო შრატები უკრაინასა (სერია №2 2008) და რუსეთის ფედერაციაში (სერია №74 ФГУП "Орловская биофабрика" , 2009 და სერია №67, 2010 ФГУП "Орловская биофабрика") დამზადებული

ანტიბიოტიკები

მიკრობთა ანტიბიოტიკომგრძნობელობის დასადგენად ცდებში გამოვიყენეთ კომერციული დოქსაციკლინის, პენიცილინის, პოლიმიქსინის, ტრიმეტოპრიმის და სულფანილამიდური პრეპარატის - სულფადიმეზინის და ბაქტრიმ-ფორტეს ქაღალდის დისკოები (მწარმოებელი: Benex Limited,Shannon, County. Made in USA/ სერია : 9079952).

ბაქტერიოფაგი

ჯილეხის სავაქცინე შტამების და ბაცილების გვარში შემავალ მიკრობთა სახეობების ფაგომგრძნობელობა მოვახდინეთ კომერციული, სპეციფიკური ჯილეხის „ გამა“ და Fah სადიაგნოსტიკო ფაგებით. (LTD ,,Eliava Biopreparation '' Tbilisi).

მეთოდები

კულტურების შესწავლა მოიცავდა მორფოლოგიური, კულტურალური, ბიოქიმიური თვისებების დადგენას, ანტიბიოტიკო და ფაგომგრძნობელობას

სეროლოგიური რეაქციები

ტყავ-ნედლეულში და ნიადაგის სინჯებში Bac. anthracis ინდიკაციისათვის გამოვიყენეთ ასკოლის (პრეციპიტაციის), პასიური ჰემაგლუტინაციის (პჰრ) რეაქციები.

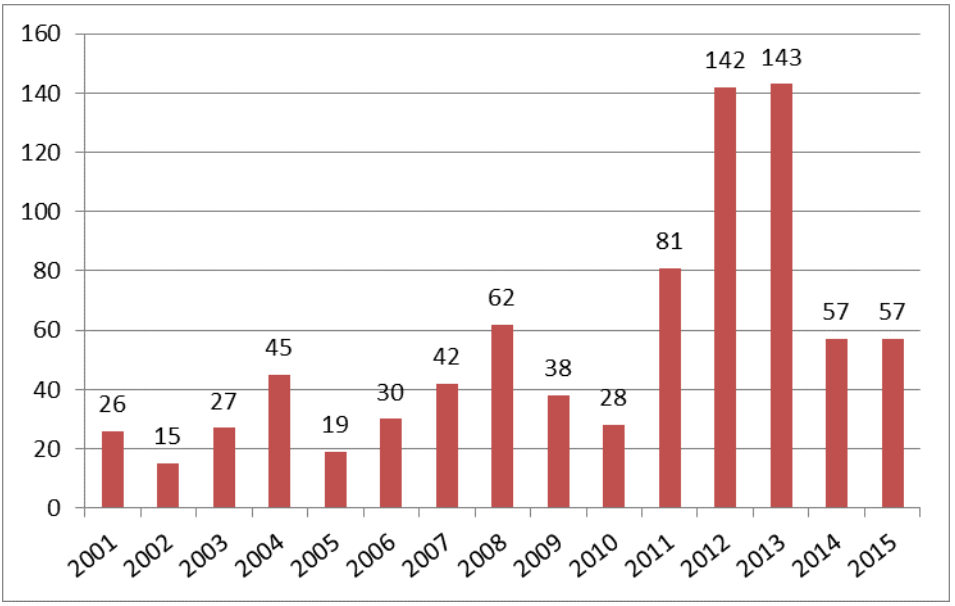
კვლევის შედეგების განხილვა

საქართველოში 2000-2015 წწ ჯილეხით ადამიანების დაავადების დინამიკა

ჩვენს მიერ მოძიებულ მასალაზე დაყრდნობით 2001-2015 წლებში ჯილეხით ადამიანების დაავადების შემთხვევათა რაოდენობამ 812 შეადგინა (დიაგრამა 1, 2).

დიაგრამა 1

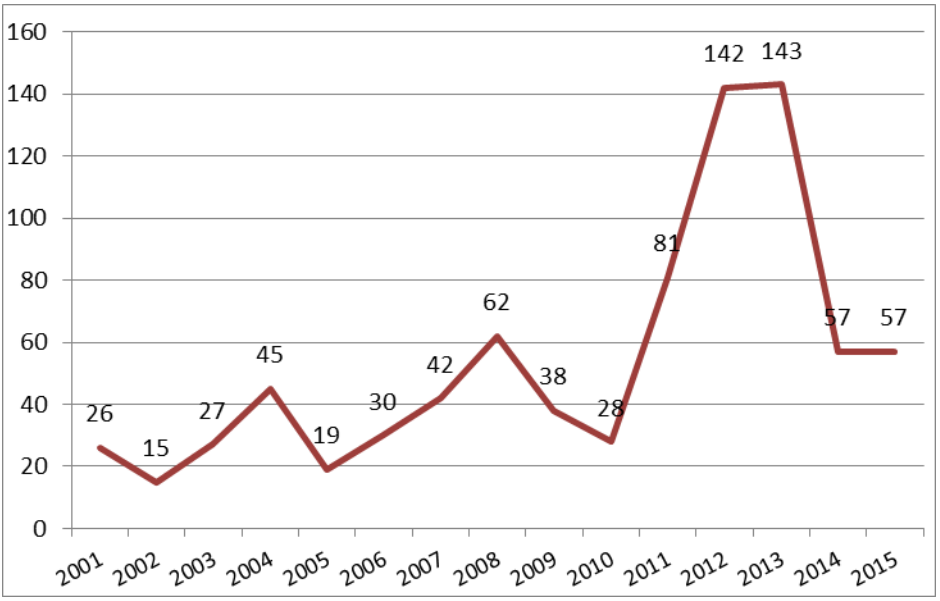
ჯილეხის შემთხვევათა კვლევის დინამიკა
2001 – 2015 წლებში



შენიშვნა: ორდინატა-შემთხვევათა რაოდენობა
აბსცისა- დაავადების შემთხვევები წლების მიხედვით

დიაგრამა 2

ჯილეხის შემთხვევათა დინამიკა
2001–2015 წლებში



შენიშვნა: ორდინატა-შემთხვევათა რაოდენობა
აბსცისა-დაავადების შემთხვევები წლების მიხედვით

როგორც დიაგრამინდან ჩანს 2001-2015 წლებში ჯილეხით ადამიანთა დაავადების 812 შემთხვიდან, დაავადების მაჩვენებელი განსაკუთრებით მაღალია 2014-20015 წლებში (142-143 შემთხვევა), ხოლო 2002-2005 წლებში შემთხვევათა მინიმალური რაოდენობაა აღრიცხული (15-19 შემთხვევა).

2000-2011 წწ. ჯილეხით დაავადებული ცხოველების რაოდენობამ 108 სული შეადგინა (გრაფიკი 1) ყველა შემთხვევაში ლეტალური გამოსავლით. ცალკეული სახეობის სასოფლო სამეურნეო ცხოველების ჯილეხით დაავადების შემთხვევები შემდეგი სტატისტიკით არის წარმოდგენილი 99 სული მსხვილფეხა პირუტყვი, 7 ცხვარი და თხა, ცხენი და 1 ღორი (ცხრილი 1) (გრაფიკი 1).

როგორც ცხრილიდან ჩანს, ჯილეხის გავრცელების მაქსიმალური რაოდენობა დაფიქსირდა 2000 წელს – 15, 2008 წელს - 12 და 20011 წელს -18 შემთხვევა. დაავადების გავრცელების კეთილსაიმედობის თვალსაზრისით

გამონაკლისია 2002 წელი როდესაც სასოფლო-სამეურნეო ცხოველებში ჯილეხის შემთხვევა არ არის რეგისტრირებული. უნდა აღინიშნოს, რომ ოფიციალური მონაცემების მიხედვით 2002 წელს, ცხოველთა ავადობის მონაცემები საგრძნობლად ჩამორჩება ანალოგიურ მაჩვენებელს ადამიანთა შორის მაგალითად, (ქვემო ქართლი, იმერეთი, სამეგრელო). ამ პერიოდში ჯილეხით ცხოველებში ჯილეხის შემთხვევა არ გვხვდება, ხოლო ადამიანების დაავადების 15 შემთხვევაა რეგისტრირებული (ცხრილი 1, გრაფიკი 1).

ცხრილი 1

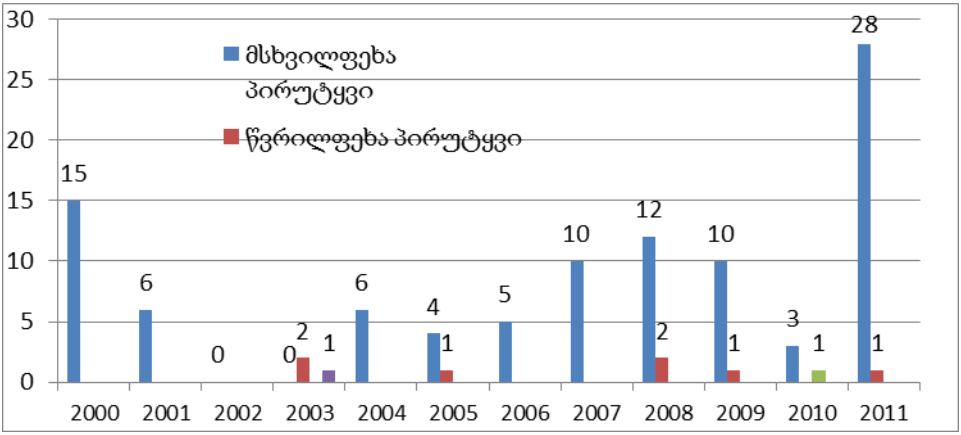
საქართველოში 2000-2011 წლებში ჯილეხით დაავადებული სასოფლო – სამეურნეო ცხოველების რაოდენობა

№	წელი	მსხვილფეხა პირუტყვი	წვრილრქიანი პირუტყვი	ღორი	ცხენი
1	2000	15/15*	-	-	-
2	2001	6/6	-	-	-
3	2002	-	-	-	-
4	2003	-	2	-	1/1
5	2004	6/6	-	-	-
6	2005	4/4	1/1	-	-
7	2006	5/5	-	-	-
8	2007	10/10			
9	2008	12/12	2/2		
10	2009	10/10	1/1	-	-
11	2010	3/3	-	-	-
12	2011	28/28	1/1	1/1	-
	სულ 108	99/99	7/7	1	1/1

შენიშვნა*: 15/15, 15 შემთხვევიდან დაიხოცა 15.

დიაგრამა 3

2000-2011 წლებში სასოფლო-სამეურნეო ცხოველების ჯილეხით დაავადების მაჩვენებლები



შენიშვნა

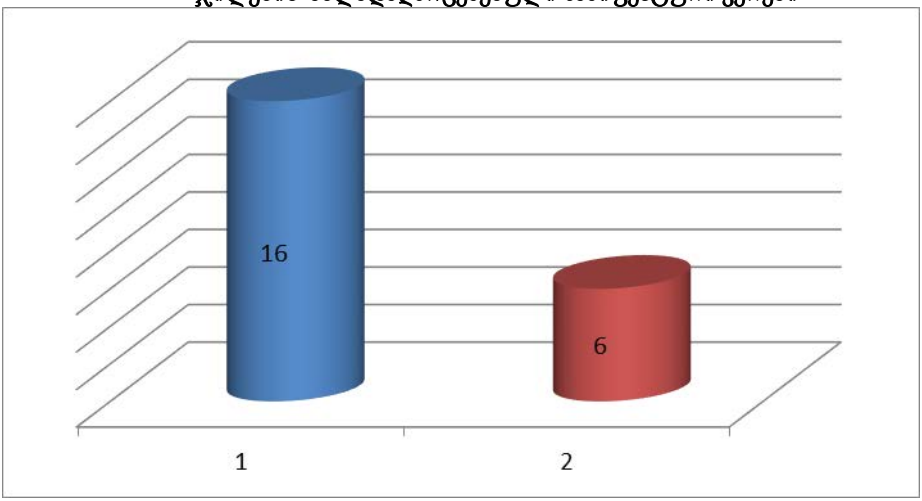
ორდინატა- ცხოველთა რაოდენობა

აბსცისა - დაავადების შემთხვევები წლების მიხედვით

ჯილეხის ეპიზოოტოლოგიაში განსაკუთრებული მნიშვნელობა ახლადაღმოცენებულ მანიფესტურ კერებს ენიჭება. ჩვენს მიერ მოძიებულ მასალაზე დაყრდნობით, საქართველოში ახლადაღმოცენებული კერების რაოდენობა ანუ კერების, რომლებიც საერთოდ არ ყოფილა აღწერილი, 22-ია (რუკა 1). ახლადაღმოცენებული კერების უმეტესობა აღმოსავლეთ საქართველოზე მოდის (16), შედარებით ნაკლები დასავლეთ საქართველოზე (6) (გრაფიკი 2). არაკეთილსაიმედო რაიონებს მიეკუთვნება: ახალქალაქის, ბოლნისის, გარდაბნის, გალის, დუშეთის, ზუგდიდის, თეთრიწყაროს, თიანეთის, მარნეულის, ნინოწმინდის, საგარეჯოს, სამტრედიის, ყაზბეგის, ცაგერის, წალკის და წყალტუბოს რაიონები.

დიაგრამა 4

ჯილეხის ახლადაღმოცენებული მანიფესტური კერები

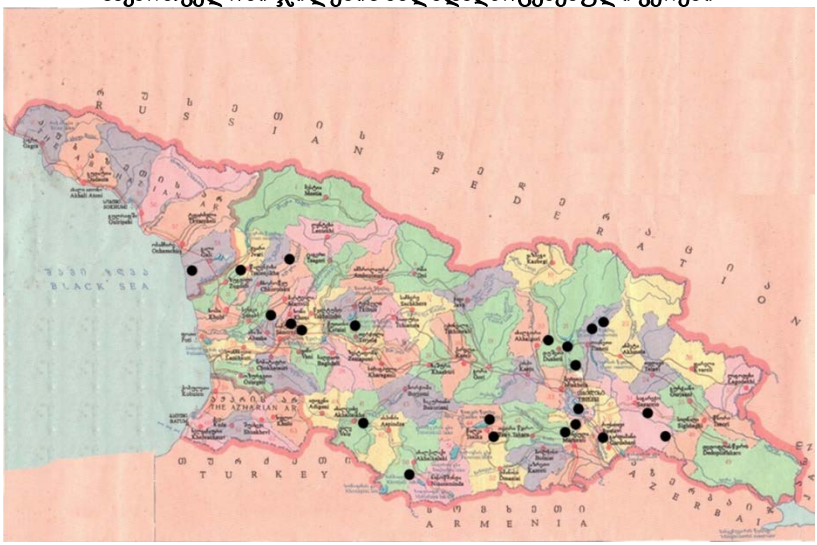


შენიშვნა

1 დასავლეთ საქართველო
2 აღმოსავლეთ საქართველო

რუკა 1

საქართველოში ჯილეხის ახლადაღმოცენებული კერები



შენიშვნა*: • – რუკაზე აღნიშნული წერტილი - ახლადაღმოცენებული კერა.

ცნობილია, რომ ჯილეხის აღმძვრელის განვითარებაზე გავლენას ახდენს რიგი ფაქტორები, მათ შორის მნიშვნელოვანია წყალბადიონთა კონცენტრაცია. ამ მიზნით კვლევის პროცესში მოვახდინეთ გამოსაკვლევი წყლის და ნიადაგის ნიმუშების pH-ის (წყალბადიონთა კონცენტრაციის) განსაზღვრა (ცხრილი 2).

კვლევის შედეგების ანალიზმა გვიჩვენა, რომ აღმოსავლეთ საქართველოში არაკეთილსაიმედო პუნქტების სიმრავლეს დასავლეთ საქართველოსთან შედარებით განაპირობებს მეცხოველეობის განვითარება, ჰუმუსით მდიდარი ნიადაგების არსებობა და ნიადაგის სუსტი ტუტე რეაქცია, რომელიც ჩვენს მიერ შესწავლილ გარდაბნის, ქარელის, ახალციხის და სხვა რაიონებში pH–7.6–8.6 ფარგლებშია და წარმოადგენს მიკრობის ხანგრძლივად ვეგეტირებისა და შესაბამისად პერსისტენციის ხელშემწყობ პირობას (იხილეთ- ცხრილი 2-3).

ცხრილი 2

ჯილეხზე გამოსაკვლევი მდინარეთა წყლების წყალბადიონთა კონცენტრაციის მაჩვენებელი

#	მდინარეთა სახელწოდება	pH
1	აბაშის წყალი	7,2
2	ალაზანი	7,2
3	ალგეთი	8,4
4	არაგვი	8,35
5	აღმოსავლეთი ფრონე	8,3
6	დასავლეთი ფრონე	8,3
7	იორი	8,45
8	ლიახვი	7,2
9	ლოჭინი	8,3
10	მეჯუდა	7,5
11	მტკვარი	7,0
12	რიონი	7,0
13	სურამულა	5,8
14	სუფსა	6,6
15	ცხენის წყალი	7,1
16	ძამა	8,35
17	ძირულა	7,35
18	ჩაილური	7,15
19	ყვირილა	7,15

ცხრილი 3

საქართველოში ჯილეხზე არაკეთილსაიმედო პუნქტების ნიადაგების ნიმუშების pH-ის მაჩვენებლები

#	**რაიონი**	**pH**
1	გარდაბნის რაიონი-სოფ. ბერლიკი	8,2
2	გარდაბნის რაიონი სოფ. ლემშვენიერა	8,15
3	ქარელის რაიონი . აბისი	7,65
4	ახალციხის რაიონი. სოფ. წყროშა	8,3
5	დედოფლისწყაროს რაიონი სოფ. წითელწყარო	8,65
6	ქ. ქუთაისი ავტოქარხნის ტერიტორია	8,4-7,95
7	ლანჩხუთის რაიონი სოფ. ლესა შუხუთი ჯაპანა ჩიბათი	6,25 6,95 5,7 6,25
8	ზუგდიდის რაიონი სოფ. რუხი	6,35
9	სენაკი	8,9

თავი 2

ჯილეხის სავაქცინე შტამების /„სტი", 34F$_2$/ და ბაცილების გვარში შემავალი სახეობების სტაბილურობის შესწავლა

სავაქცინე შტამების ნიშან–თვისებების, კერძოდ მორფოლოგიური, კულტურალური, ტინქტონიალური, საქაროლიზური და სხვა თვისებების შესაძლო ცვლილებებიდან გამომდინარე, ჩვენს მიერ შესწავლილი იქნა ექსპერიმენტში გამოყენებული შტამების სტაბილურობა (ცხრილი 4, 5, 6, 7, 8, 9).

ამ მიზნით კვლევებში გამოვიყენეთ ჯილეხის სავაქცინე „სტი" და 34F$_2$ შტამები, აგრეთვე ბაცილების გვარში შემავალი შემდეგი სახეობის მიკროორგანიზმები: Bac. cereus, Bac. megatherium; Bac. subtilis, Bac. mycoides და Bac. Mesentericus .

ცხრილი 4

ჯილეხის სავაქცინე შტამებისა და Bacillus გვარში შემავალი ზოგოერთი სახეობების მორფოლოგიური და ტინქტონიალური თვისებები

№	სავაქცინე შტამი	გრამის წესით შეღებვა	სპორა	კაფსულა	მოძრაობა
1	Bac. anthracis „სტი"	+	+	-	-
2	Bac. anthracis 34 F$_2$	+	+	-	-
3	Bac. cereus	+	+	+	+
4	Bac. megatherium	+	+	-	+
5	Bac. mesentericus	+	+	-	+
6	Bac. subtilis	+	+	-	+
7	Bac. mycoides	+	+	-	+

შენიშვნა: * – ჯილეხის სავაქცინე შტამები უძრავებია, ხოლო ბაცილების გვარის სხვა სახეობები მოძრავი;

ცხრილი 5

ჯილეხის სავაქცინე შტამების და Bacillus გვარის მიკრობთა კულტურალური ნიშან-თვისებები

№	მიკრობის დასახელება	ზრდის თავისებურება			ჟელატინის გაჯირჯვება
		ბრეინჰარტის ბულიონი	ბრეინჰარტის აგარი (კოლონიები)/	კოლონიის ფორმა	
1	Bac. anthracis „სტი“	ოდნავი ოპალესცენცია, ბამბის ფთილისებრი ნალექი	მედუზისებრი კოლონიები	RO *	გადმობრუნებული ნაძვის
2	Bac. anthracis „34F_2“	გამჭვირვალე, ბამბის ფთილისებრი ნალექი.	მოთეთრო–რუხი, ლომის ფაფრისებრი კოლონია	R	„————————”
3	Bac. cereus	აპკი, ფანტელები, შემღვრევა	მქრქალი კულულისებრი კოლონია	R	ძაბრის
4	Bac. megatherium	შემღვრევა. აპკი	დანაოჭებული გამონაზარდებით	RO	ძაბრისებრი
5	Bac. mesentericus	აპკი. შემღვრევა	ნაოჭისებრი, ლორწოვანი	S	ნაძვის ან ძაბრისებრი
6	Bac. subtilis	აპკი, ფანტელი გამჭვირვალე	მორუხო–თეთრი ზოგჯერ წაბლისებრი დანაოჭებული	R	ცილინდრისებრი
7	Bac. mycoides	დანაოჭებული აპკი	მორუხო–თეთრი ზოგჯერ წაბლისებრი დანაოჭებული	R	„————————”

შენიშვნა: * R ხორკლიანი კოლონია; O -გლუვი კოლონია; S-ლორწოვანი

ცხრილი 6

ჯილეხის სავაქცინე და Bacillus გვარში შემავალი მიკრობთა ფერმენტული აქტივობა

№	სავაქცინე შტამი	რძის შედედება	მეთილენის ლურჯის რედუქცია	ჟელატინის ჰიდროლიზი	ჰემოლიზური აქტივობა	H_2S	NH_3
1	Bacillus anthracis „სტი“	+*	+	+	-	+	+
2	Bacillus anthracis $34F_2$	+	+	+	-	+	+
3	Bacillus cereus	+	+	+	+	-	+
4	Bacillus megaterium	+	+	+	+	+	+
5	Bacillus mesenterius	+	+	+	+	+	+
6	Bacillus subtilis	+	+	+	+	+	+
7	Bacillus mycoides	+	+	+	+	+	+

შენიშვნა * + დადებითი რეაქცია; – უარყოფითი რეაქცია.

ცხრილი 7

ჯილეხის სავაქცინე და Bacillus გვარში შემავალი მიკრობების საქაროლიზური თვისებები

№	მიკრობის დასახელება	ნახშირბადის ფერმენტაცია					
		გლუკოზა	ლაქტოზა	საქაროზა	არაბინოზა	მანიტი	სახამებელი
1	Bac. anthracis „სტი“	მ*	-	მ	-	-	მ
2	Bac. anthracis $34F_2$	მ	-	მ	-	-	მ
3	Bac. cereus	მ	მ	მ	მ	-	-
4	Bac. megaterium	მ	მ	მ	-	-	მ

5	Bac. mesentericus	მ	მ	მ	-	-	მ
6	Bac. subtilis	მ	მ	მ	-	-	მ
7	Bac. mycoides	მ	მ	მ	-	-	-

შენიშვნა*: მ – მჟავის წარმოქმნა; – მჟავას არ წარმოქმნის.

ცხრილი 8

ჯილეხის სავაქცინე შტამების და ბაცილების გვარის სხვა სახეობების ფაგომგრძნობელობა

№	კულტურები	ფაგები	
		გამა ფაგი	Fah ფაგი
1	B. anthracis "sti"	4+*	4+
2	B. anthracis 34 F_2	4+	4+
3	B. cereus	R*	R
5	B. subtilis	R	R
6	B. megatherium	R	R
7	B. mesentericus	R	R

შენიშვნა* R –შტამი რეზისტენტულია; 4+ მაღალმგრძნობიარე.

ცხრილი № 9

ჯილეხის სავაქცინე შტამების და ბაცილების გვარის სხვა სახეობების ანტიბიოტიკომგრძნობელობა

№	კულტურები	ანტიბიოტიკები					
		პოლიმიქსინი	ბაქტრიმფორტე	ტრიმეტოპრიმი	პენიცილინი	დოქსაციკლინი	სულფადიმეზინი
1	B. anthracis „sti"	R*	R	4+	4+	4+	4+
2	B. anthracis 34F_2	R	R	4+	4+	4+	4+

3	B. cereus	3+	4+	R	4+	4+	3+
4	B. subtilis	3+	4+	2+	4+	4+	3+
5	B. megaterium	R	3+	R	4+	4+	R

შენიშვნა* R –შტამი რეზისტენტულია; (ლიზისის ხარისხი არ გამოვლინდა),

2+ სუსტად მგრძნობიარე;

3+ საშუალოდ მგრძნობიარე,

4+ მაღალმგრძნობიარე (მიუთითებს მიკრობთა სრულ ლიზისზე).

ცხრილში მოცემული კვლევის შედეგები ცხადყოფს, რომ ჩვენს მიერ გამოყენებული ჯილეხის სავაქცინე შტამები ,,სტი'' და 34 F_2, აგრეთვე Bacillus გვარში შემავალი შტამები სტაბილური ნიშან–თვისებების მქონე მიკროორგანიზმებია. მათ ახასიათებთ ტიპური ზრდა ბულიონსა და აგარზე, კაფსულას არ გამოიმუშავებენ, წარმოქმნიან სპორას, იძლევიან R და RO ფორმის კოლონიებს, მათთვის დამახასიათებელია არაჰემოლიზურობა, ,,მარგალიტის ყელსაბამის'' ფენომენი. (იხილეთ ცხრილი № 4,5,6,7). ჯილეხის სავაქცინე შტამები „სტი“, 34F_2 მგრძნობიარეა პენიცილინის, ტრიმეტროპრიმის და დოქსაციკლინის მიმართ /4+/, ხოლო რეზისტენტული პოლიმიქსინისა და ბაქტრიმფორტესადმი. საპირისპირო აღმოჩნდა ბაცილების სხვა სახეობათა ანტიბიოტიკომგრძნობელობა. Bac. subtilis და Bac. cereus მაღალმგრძნობიარე აღმოჩნდა ბაქტრიმფორტეს, პენიცილინისა და დოქსაციკლინის მიმართ. ანალოგიური აღმოჩნდა Bac. megatherium პენიცილინისა და დოქსაციკლინის მიმართ. პოლიმიქსინისა და სულფანილამიდური პრეპარატის – სულფადიმეზინის მიმართ კი რეზისტენტული. (ცხრილი № 8).

ცდის შედეგები გვიჩვენებს, რომ ჯილეხის სავაქცინე შტამების ,,სტი'' და 34F_2 მაღალი მგრძნობელობა ახასიათებთ გამა– და Fah – ფაგებისადმი, რაც ლიზისის ხარისხში აისახა (ცხრილი 9), ხოლო ჩვენს ექსპერიმენტში გამოყენებული ბაცილების გვარში შემავალი მიკრობები აღნიშნული ფაგების მიმართ რეზისტენტულია.

თავი 3

ჯილეხის იმუნოდიაგნოსტიკის გაუმჯობესებული ტესტ-სისტემის შემუშავება

ჯილიხის სადიაგნოსტიკო ტესტ-სისტემის დამზადების საწყისი ეტაპი ჩვენს ცდებში მოიცავდა მაღალი ტიტრის საპრეციპიტაციო შრატის შერჩევას. ეს უკანასკნელი აუცილებელი წინაპირობაა იმისათვის, რომ ზუსტად ვიცოდეთ რამდენად მაღალია შრატის აქტივობა. ამ მიზნით პასიური ჰემაგლუტინაციის რეაქციით (ჯილეხის ანტიგენური დიაგნოსტიკუმის გამოყენებით) გამოკვლევებში გამოვიყენეთ კომერციული: უკრაინისა (სერია №2 2008) და რუსეთის ფედერაციაში (სერია №72, 2009 და სერია №67, 2010) დამზადებული ჯილეხის საპრეციპიტაციო შრატები. ცდის შედეგები მოცემულია ცხრილი 10-ში.

ცხრილი 10

ჯილეხის ჰიპერიმუნური შრატების სპეციფიკური აქტივობა (ტიტრი)

№	შრატების დასახელება	მწარმოებელი ქვეყანა	ტიტრები (ჰპარ)
1	საპრეციპიტაციო შრატი სერია 2	უკრაინა	1:100.000
2	საპრეციპიტაციო შრატი სერია 74	რუსეთი	1:50.000
3	საპრეციპიტაციო შრატი სერია 67	რუსეთი	1:50.000

როგორც ცხრილიდან ჩანს, პასიური ჰემაგლუტინაციის რეაქციით გამოკვლეული სამი საპრეციპიტაციო შრატიდან ყველაზე მაღალი აქტივობით გამოირჩეოდა უკრაინული წარმოების საპრეციპიტაციო შრატი (ს–2), რომელშიც ჯილეხის საწინააღმდეგო ანტიბაქტერიული ანტისხეულების ტიტრმა (ჰჰრ-ში) შედგინა -1:100.000, ანუ ამ განზავებაში მივიღეთ დადებითი შედეგი, რაც მნიშვნელოვნად აღემატება დანარჩენ შრატებში ანტისხეულების შემცველობას. დადგენილია, რომ მაღალტიტრიანი შრატებიდან მიღებული იმუნოგლობულინით დამზადებული სადიაგნოსტიკო პრეპარატი უფრო მგრძნობიარეა.

აღნიშნული საპრეციპიტაციო შრატებიდან გლობულინის მიღება განხორციელდა სპირტული მეთოდით მეთანოლის გამოყენებით (Dubert at al.1953). ნარჩენი სპირტისა და სხვა დაბალ მოლეკულური მინარევების

მოსაცილებლად იმუნოგლობულინური ხსნარის გაწმენდას ვაწარმოებდით დიალიზით (სადიალიზო პარკის ფორების ზომა შეადგენდა 10,000 კილოდალტონს). პრეპარატის სპეციფიკურობის ასამაღლებლად ვახდენდით ნედლეულის – ჯილეხის საპრეციპიტაციო შრატის ადსორბციას Bacillus-ს გვარის სახეობების cereus და megatherium-ს გამოყენებით. კულტურების ჩამორეცხვის შემდეგ არსებული სიმღვრივის სტანდარტის მიხედვით ვამზადებდით თანაბარი მოცულობის 2 მლრდ/მლ კონცენტრაციას. შრატის ყოველ 1 მლ-ს ვამატებდით ბაქტერიული სუსპენზიის 0.1 მლ, შენჯღრევის შემდეგ ვდგამდით თერმოსტატში 15-20 წუთი 37°C-ზე. ადსორბციის შემდეგ სუსპენზიას ვაცენტრიფუგირებდით 6000 ბრ/წთ 15 წთ განმავლობაში, შემდეგ შრატს ვფილტრავდით სასტერილიზაციო ფილტრში – millipore (ფორის ზომა - 0,22 μm).

მაღალმგრძნობიარე, აქტიური სადიაგნოსტიკო ტესტ-სისტემის მომზადების ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი ეტაპი არის ადსორბენტის (ერითროციტები) სტაბილიზაციის მეთოდის შრჩევა. ამ მიზნით ჩვენს ექსპერიმენტში გამოვიყენეთ ერითროციტების ფორმალდეჰიდით დამუშავების სხვადასხვა მეთოდი. (ცხრილი 11) როგორც ცხრილიდან ჩანს Csizmas მეთოდით დამუშავებული ერითროციტების გამოყენებით აღმოჩენილი მიკრობთა რაოდენობა 400 ათასს (3+) შეადგენს, Меньшов, Шмутер 1978-ის მეთოდით 100 ათასს, ხოლო Маянский с соавт. 1968 მეთოდით კი შესაძლებელი გახდა 25 ათასი მიკრობის აღმოჩენა. მიღებულ შედეგებზე დაყრდნობით გამოვლინდა, რომ მაიანსკის და თანაავტორთა მიერ შემუშავებული მოდიფიცირებული მეთოდი უზრუნველყოფს ჯილეხის მაღალმგრძნობიარე, სპეციფიკური ტესტ-სისტემის მიღებას.

ცხრილი 11

სხვადასხვა მეთოდით დამუშავებული ერითროციტების სპეციფიკურობის შესწავლა

#	ერითროციტების ფორმალინიზაცია	აღმოჩენილი მიკრობების რაოდენობა (ათასი)								
		1600	800	400	200	100	50	25	12,5	6
1	Csizmas 1960	+++ *	+++	+++	++	-	-	-	-	-
2	Меньшов, Шмутер 1978	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-
3	Маянский с соавт. 1968	+++	+++	+++	+++	+++	++++	+++	++	-

შენიშვნა: 4+; 3+ – დადებითი პასუხი (გამოვლენილი მიკრობების რაოდენობა);
2+ ; +; – უარყოფითი პასუხი.

დიაგნოსტიკუმის დასამზადებლად ფორმალინიზირებულ ერითროციტებს ვრეცხავდით ნატრიუმის ქლორიდის 0.9 %-ანი ხსნარით და ვახდენდით რესუსპენდირებას ამავე ხსნარით (pH=7.0-7.2) და ვამზადებდით ერითროციტების 2,5%-იან შენაწონს. აღნიშნულ სუსპენზიაში ერითროციტების რაოდენობა შეადგენდა 5-6.10^5 უჯრედს. მზა პრეპარატის სპეციფიკურობის და მგრძნობელობის ამაღლების მიზნით (ერითროციტების ზედაპირიდან ცილოვანი და სხვა ნაერთების მოსაცილებლად), 5 მილილიტრ 2,5%-იან სუსპენზიას ვამატებდით ორქრომმჟავა კალიუმის ($K_2CR_2O_7$) სხვადასხვა განზავების (1:1000; 1:5000; 1:20 000) თანაბარ მოცულობას და ვათავსებდით თერმოსტატში 37°C 20 წუთის განმავლობაში. კალიუმის ბიქრომატით დამუშვებულ ერითროციტებს ვრეცხავდით ნატრიუმის ქლორიდის 0.9%-იანი სხნარით და ვამზადებდით 2,5%-იან სუსპენზიას. სპეციფიკურობის და მგრძნობელობის თვალსაზრისით საუკეთესო შედეგი მიღებულ იქნა ფორმალინიზირებული ერითროციტების კალიუმის ბიქრომატით 1:5000-ზე განზავებით დამუშავების შემთხვევაში.

ერითროციტების 2,5% სუსპენზიის 5 მლ ვამატებდით ტანინის მჟავას (კონცენტრაცია 2,0X10^4) თანაბარი მოცულობით და ვათავსებდით თერმოსტატში 37°C 20 წთ განმავლობაში, შემდეგ 2-ჯერ ვრეცხავდით 1/15 M ფოსფატის ბუფერით pH=7,2 და ერთხელ 1/15 M ფოსფატის ბუფერით pH=6,4. ჩამორეცხილი ერითროციტების რესუსპენზირებას ვახდენდით ნატრიუმის ქლორიდის 0.9%-იანი ხსნარით 2,5%-იან კონცენტრაციამდე და ვამატებდით სენსიტინს-ჯილეხის საწინააღმდეგო იმუნოგლობულინს.

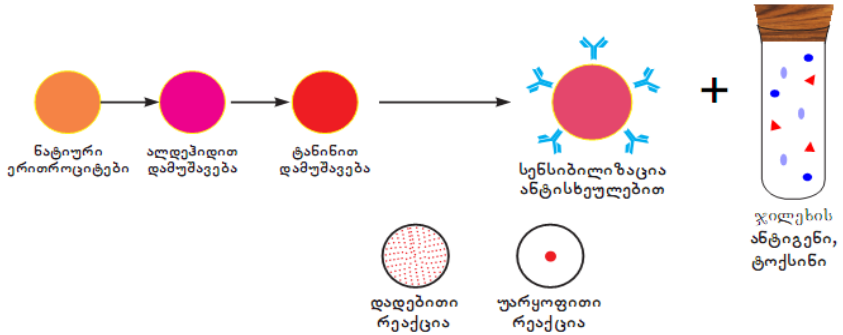
სადიაგნოსტიკო ტესტ-სისტემების დამზადების პროცესში განსაკუთ-რებული მნიშვნელობა ენიჭება ფორმალინიზირებული და კალიუმის ბიქრომატით დამუშვებული ერითროციტების სენსიბილიზაციას (ანტისხეუ-ლებით დატვირთვას). ცილებით ერითროციტების სენსიბილიზაციის პროცესი სენსიტინისა და ადსორბენტის ურთიერთქმედება რთული მექანიზმია, რომლის რაოდენობრივი დახასიათება დღეისათვის ბოლომდე არ არის შესწავლილი. ცნობილია, რომ ოპტიმალური ჰემოსენსიბილიზაცია დამოკიდებულია სენსიტინის კონცენტრაციაზე, სენსიბილიზაციის ხანგრძლივობაზე, სხნარის ტემპერატურაზე და წყალბადიონთა კონცენტრაციაზე (pH) და სხვა.

ტანინის მჟავით (1:20000) დამუშავებული ერითროციტების სენსიბი-ლიზაციას ჯილეხის საწინააღმდეგო იმუნოგლობულინით ვახდენდით თერმოსტატში 37°C 3 საათის განმავლობაში, სუსპენზიის პერიოდული შენჯღრევით, შემდეგ ნარევი გადაგვქონდა მაცივარში +6 +8 ^{o}C–ზე, 10–16 საათის განმავლობაში. სენსიბილიზაციის დამთავრებამდე ნახევარი საათით ადრე სუსპენზიას ვუმატებდით 1% ფორმალინს სენსიტინის, სტაბილიზაციის მიზნით. იმუნოგლობულინის ოპტიმალური სასენსიბილიზაციო დოზის განსაზღვრას ვაწარმოებდით ექსპერიმენტულად, რისთვისაც თანაბარ მოცულობა ერითროციტებზე (5 მლ) ვიღებდით ჯილეხის იმუნოგლობულინის სხვადასხვა დოზას (ყოველ 1 მლ 2,5 %-ან ერითროციტების სუსპენზიაზე 50 მკგ, 80 მკგ, 150 მკგ და 200 მკგ ცილა). ცდებით დავადგინეთ, რომ იმუნოგლობულინის

ოპტიმალური სასენსიბილიზაციო დოზა 150-160 მიკროგრამია. აღნიშნული დოზით დატვირთული ერითროციტები ხასიათდებიან მაღალი მგრძნობელობით, რაც დადასტურდა საკვლევ სუსპენზიაში 20-25 ათასი მიკრობული ერთეულის აღმოჩენით (ჯილეხის „სტი" ვაქცინა).

სქემა 1

ჯილეხის ანტიგენის (მიკრობის კედლის ანტიგენი, ტოქსინი) განსაზღვრა პასიური ჰემაგლუტინაციის რეაქციაში



ჯილეხის იმუნოგლობულინის ოპტიმალური დოზის გამოყენებით დამზადებული იქნა სადიაგნოსტიკო ტესტ-სისტემა, რომლის სპეციფიკურობა და მგრძნობელობა შესწავლილ იქნა ჯილეხის სავაქცინე შტამებზე (სტი-1 ვეგეტატიური ფორმა; სტი-1 სპოროვანი ფორმა; $34F_2$– ვეგეტაციური ფორმა; ჯილეხის სავაქცინე შტამი- Ikhtiman ვეგეტაციური ფორმა) და Bacillus გვარის წარმომადგენლებზე (B.cereus, B.anthracoides, B.thuringiensis, B.megaterium, B.subtilis). მიღებული შედეგები მოცემულია ცხრილში (ცხრილი 12).

ცხრილი 12

ჯილეხის სადიაგნოსტიკო ტესტ-სისტემის მგრძნობელობა და სპეციფიკურობა პჰრ-ში

#	გამოყენებული შტამები	აღმოჩენილი მიკრობების რაოდენობა (ათასი)								
		1600	800	400	200	100	50	25	12,5	6
1	სტი-1 სპორა	++++ *	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	+

2	სტი-1 ვეგეტატიური	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+
3	$34F_{2-}$ ვეგეტატიური	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+
4	B.anthr.Ikhtiman ვეგეტატიური	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	+
5	B.cereus	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	B.anthracoides	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	B.thuringiensis	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	B.megaterium	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	B.subtilis	-	-	-	-	-	-	-	-	-

შენიშვნა: * +++ – გამოვლენილი მიკრობების რაოდენობა;
++ და – უარყოფითი პასუხი.

როგორც ცხრილიდან ჩანს, შემუშავებულ სადიაგნოსტიკო ტესტ-სისტემით შესაძლებელია 20-50 ათასი „სტი“ სავაქცინე შტამის, $34F_2$ და Ikhtiman -ის მიკრობული ვეგეტატიური უჯრედის, და 40–50 ათასი ,,სტი-1” სპორის აღმოჩენა. შემუშვებული სადიაგნოსტიკო ტესტ-სისტემის აუღრესად დადებით მხარედ შეიძლება ჩაითვალოს ის ფაქტი, რომ ის უარყოფით შდეგებს იძლევა B.cereus-ს გვარის მიკრობებთან, რაც ადასტურებს ტესტ-სისტემის სპეციფიკურობას.

ჩვენს მიერ შემუშავებული ტესტ-სიტემის მგრძნობელობა შესწავლილ იქნა სხვა ტექნოლოგიით მიღებული ანალოგიურ სადიაგნოსტიკო პრეპარატთან. კვლევის შედეგები წარმოდგენილია მე-13 ცხრილში.

ცხრილი 13

ჯილეხის სადიაგნოსტიკო ტესტ-სისტემის მგრძნობელობა

#	საცდელი ტესტ-სისტემის დასახელება	ჯილეხის სპოროვანი ვაქცინის (სტი-1) გამოვლენილი რაოდენობა	სარწმუნო განსხვავება (P)
1	ტესტ-სისტემა, მომზადებული ჩვენს მიერ შემუშავებული მეთოდით	17,9±2,5	<0,01
2	დიაგნოსტიკუმი მომზადებული Фомичева და თანაავტ. 1971 მეთოდით.	192,0±15,0	<0,05

შემუშავებული სადიაგნოსტიკო ტესტ-სისტემის შედარებითმა შეფასებამ აჩვენა მისი მაღალი მგრძნობელობა. ცდებმა დაადასტურა, რომ ჩვენს მიერ

შემუშავებული ტესტ-სისტემა თავისი აქტივობით 10-ჯერ აღემატება არსებულ ანალოგიურ პრეპარატს .

ამრიგად, ჩატარებულ სამუშაოს თუ შევაჯამებთ შეიძლება ითქვას, რომ შემუშავებულია ახალი სადიაგნოსტიკო ტესტ-სისტემა (კიტი) ჯილეხის ერითროციტული იმუნოგლობულინური დიაგნოსტიკუმი, რომელიც ხასიათდება მაღალსპეციფიკურობით და გრძნობელობით. შემუშავებული სადიაგნოსტიკო ტესტ–სისტემის დანიშნულებაა, ჯილეხის გამომწვევის აღმოჩენა პათოლოგიურ მასალაში, მათ შორის ტყავ–ნედლეულში და ჯილეხზე საეჭვო გარემო არის ობიექტებში. ტესტ–სისტემა საშუალებას იძლევა ერთდროულად მრავალ ათეულ სინჯს ჩაუტარდეს რეტროსპექტული ანალიზი B. anthracis გამოსავლენად.

სადიაგნოსტიკო პრეპარატის ვადის გახანგრძლივების და სტაბილურობის შენარჩუნების მიზნით ვაწარმოებდით მის ლიოფილიზაციას ჟელატოზა–საქაროზას ნიადაგში (5% ჟელატინი, 7% საქაროზა). აღნიშნულ ნიადაგში გახსნის შემდეგ ნახევარ ფაბრიკატს ვყინავდით –40–45°C–ზე. შრობა მიმდინარეობდა შემდეგ რეჟიმში: საწყისი ტემპერატურა საშრობ აპარატში იყო 16–20°C, ვაკუუმი 20–30 10^3 მმ სინდიყის სვეტის, შემდეგ ტემპერატურა იმატებდა 6–8 საათის განმავლობაში +2 +4°C –ით, ბოლოს ტემპერატურა იწევდა 25–28°C–მდე, 10–12 საათის განმავლობაში.

მშრალი სადიაგნოსტიკო ტესტ–სისტემის სპეციფიკურ აქტივობას ვამოწმებდით ლიოფილიზაციიდან ყოველ 6 თვეში. შემოწმებამ გვიჩვენა, რომ პრეპარატი აქტივობას ინარჩუნებდა 2 წლის განმავლობაში. აქედან გამომდინარე შეიძლება ითქვას, რომ აღნიშნული ტესტ–სისტემის ვარგისიანობის ვადა 2 წელია.

ჯილეხის სადიაგნოსტიკო ტესტ-სისტემის სპეციფიკურობის შესწავლა

ნიადაგსა და წყალში გავრცელებული Bacillus-ის გვარის მიკრობები ხასიათდებიან (Bac. subtilis, Bac. megaterium, Bac. mesentericus, Bac. mycoides, Bac. cereus), ანტიგენური მსგავსებით, ჯილეხის აღმძვრელთან. ეს კი გვაძლევს საკვლევ ობიექტებზე პასიური ჰემაგლუტინაციის რეაქციაში მივიღოთ დადებითი, არასპეციფიკური ცრუ შედეგი.

აღნიშნულის გათვალისწინებით შემოთავაზებული ტექნოლოგიით მიღებული ტესტ-სისტემა დამატებით შესწავლილ იქნა სპეციფიკურობაზე ხელოვნურად კონტამინირებულ გარემო არის ობიექტებში: ნიადაგი, წყალი, ტყავ-ნედლეული.

პასიური ჰემაგლუტინაციის რეაქციის პარალელურად ასკოლის რეაქციით მოვახდინეთ „სტი“ სავაქცინე შტამით ხელოვნურად კონტამინირებული ტყავისა და ნიადაგის ნიმუშების გამოკვლევა (ცხრილი 14).

ცხრილი 14

ჯილეხის სადიაგნოსტიკო ტესტ-სისტემის სპეციფიურობის მაჩვენებლები

	მიკრობის დასახელება	სპეციფიკურობა			
№		პასიური ჰემაგლუტინაციის რეაქცია		ასკოლის რეაქცია	
1	Bac. anthracis „სტი”	+	+	+	+
2	Bac. anthracis $34F_2$	+	+	+	+
3	Bac. cereus	-	-	+	+
4	Bac. megaterium	-	-	-	-
5	Bac. mesenterium	-	-	-	-
6	Bac. subtilis	-	-	-	-
7	Bac. mycoides	-	-	-	-

შენიშვნა: + რეაქცია დადებითია; - რეაქცია უარყოფითი

მიღებულმა შედეგებმა გვიჩვენა, რომ ბაცილების სახეობებით კონტამინირებული ნიადაგის ნიმუშების აღნიშნულ რეაქციაში გამოკვლევისას ყველა შემთხვევაში შედეგები აღმოჩნდა უარყოფითი, რაც ნათლად ადასტურებს გამოყენებული ტესტ-სისტემის სპეციფიურობას (პჰრ) (ცხრილი 14). პრეციპიტაციის რეაქციის დროს შედეგების აღრიცხვისას B. cereus –მა მოგვცა დადებითი შედეგი.

შემდეგ ეტაპზე გამოკვლეული იქნა ჩვენს მიერ შემუშავებული ტესტ–სისტემის მგრძნობელობა. ამ მზინით ავიღეთ ხელოვნურად კონტამინირებული შემდეგი ნიმუშები: ნიადაგი, წყალი, ტყავ–ბეწვეული, ნიმუშებში შეტანილ იქნა განსაზღვრული რაოდენობის „სტი“ ვაქცინის სპორა (ცხრილი 15).

ცხრილი 15

„სტი“ სავაქცინე შტამით ხელოვნურად კონტამინირებული ნიმუშები

გამოვლენილ მიკრობთა რაოდენობა / ნიმუში	მიკრობთა საერთო რაოდენობა (პჰრ)										
	12.5 მლნ	6.3 მლნ	3.65 მლნ	1.7 მლნ	850 ათასი	425 ათასი	212 ათასი	106 ათასი	53 ათასი	25.15 ათასი	12 ათასი
ნიადაგი	+*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
ტყავი	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
წყალი	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
შრატის კონტროლი	-										
დიაგნოსტიკუმის კონტროლი	-										

შენიშვნა: * + დადებითი, – უარყოფითი.

ჩვენს მიერ შემუშავებული ტესტ–სისტემით ჩატარებული რეაქციით მიღებული შედეგების ანალიზმა გვიჩვენა, რომ აღნიშნულ ობიექტებში შეიძლება აღმოჩენილ იქნას საძიებელი სავაქცინე შტამის მინიმალური რაოდენობა -20-50 ათასი მიკრობული სხეული, ხოლო წყალში -10 ათასამდე მიკრობი. (დადებითი რეაქციის დროს პენოპლასტის ფოსოებში ნალექი დალექილია ქოლგისებურად). სინჯებში, სადაც იყო განთესილი Bacillus–ს გვარის ზემოთ ჩამოთვლილი მიკროორგანიზმები, ყველგან მიღებულ იქნა უარყოფითი შედეგი. ანალოგიური შედეგი დაფიქსირდა ასკოლის, ანუ პრეციპიტაციის რეაქციის შედეგების აღრიცხვისას (ცხრილი 16).

ცხრილი 16

„სტი“ სავაქცინე შტამით ხელოვნურად კონტამინირებული ნიადაგის, ტყავის და წყლის ნიმუშების ასკოლის რეაქციით გამოკვლევის შედეგები.

გამოვლენილ მიკრობთა რაოდენობა / ნიმუში	მიკრობთა საერთო რაოდენობა							
	12.5 მლნ	6.3 მლნ	3.65 მლნ	1.7 მლნ	850 ათასი	425 ათასი	212 ათასი	106 ათასი
ნიადაგი	+*	+	+	+	–	–	–	–

ტყავი	+	+	+	+	–	–	–	–
წყალი	+	+	+	+	–	–	–	–
ანტიგენის კონტროლი	+	+	+	+				

შენიშვნა: * + დადებითი,
- უარყოფითი.

მიღებულმა შედეგებმა ცხადყო, რომ ასკოლის რეაქციით შესაძლებელია 2 მილიონი და უფრო მეტი მიკრობული უჯრედის აღმოჩენა.

სადიაგნოსტიკო ტესტ–სისტემის მგრძნობელობა (სპეციფიკური აქტივობა) შესწავლილ იქნა თეთრ თაგვებზე (ცხრილი 17). რომელთა ცოცხალი მასა 18–20 გრ. წინასწარ (48სთ ადრე) ცხოველები ინტრაპერიტონეალურად დავასნებოვნეთ ჯილეხის სავაქცინე შტამის (34F_2) ერთი მილიონი (1,0x10^6) კოლონიაწარმომქნელი ერთეულით. ვაქცინის შეყვანიდან 6 საათის შემდეგ, ცხოველებს ინტრაორბიტალურად პასტერის პიპეტით ავუღეთ სისხლი და გამოვყავით შრატი. მოვახდინეთ კომპლემენტის ინაქტივაცია, რისთვისაც შრატი გავათბეთ 56^{0}C–ზე, ჰემაგლუტინინების მოსაცილებლად შრატის ადსორბცია მოვახდინეთ იმავე სერიის ერითროციტებით, რაც გამოვიყენეთ დიაგნოსტიკუმის დასამზადებლად (ცხრილი 17).

ცხრილი 17

ჯილეხის სადიაგნოსტიკო ტესტ–სისტემის შესწავლა მგრძნობელობაზე თეთრ თაგვებზე

გამოყენ ე ბული ვაქცინა	ვაქცინის დოზა ინტრაპერიტო ნ.	გამოკვლეული ორგანოები და შედეგები				
		ღვიძლი *	ელენთ ა	შრატ ი	ფილტვ ი	თირკმელ ი
34 F_2	1,0x10^6 კწე	+	+	+	+	_

შენიშვნა:* – კწე –კოლონია წარმომქმნელი ერთეული;
– + დადებითო რეაქცია;
– - უარყოფითი რეაქცია.

ცდებით დავადგინეთ, რომ დადებითი შედეგი, ანუ ვაქცინა აღმოჩენილ იქნა ცხოველების შრატის, ღვიძლის, ფილტვის და ელენთის გამოკვლევისას, რაც ადასტურებს სავაქცინე შტამის არსებობას აღნიშნულ ორგანოებში.

უარყოფითი პასუხი მიღებული იქნა ფილტვის გამოკვლევისას. მიღებული შედეგი გვიჩვენებს, რომ ჩვენს მიერ შემუშავებული გაუმჯობესებული ტესტ–სისტემის გამოყენება მიზანშეწონილია ჯილეხზე საეჭვო ცხოველების გამოსაკვლევად.

კონტორლის მიზნით გამოვიკვლიეთ ჯანმრთელი ცხოველების ანალოგიური ორგანოების ნიმუშები. ყველა შემთხვევაში მიღებული იქნა უარყოფითი შედეგი.

ჯილეხის სადიაგნოსტიკო ტესტ-სისტემით (პჰრ) წყლის, ნიადაგის და პათოლოგიური მასალის გამოკვლევა

სადისერტაციო თემით გათვალისწინებული კვლევითი სამუშაოები ითვალისწინებდა ტყავ-ნედლეულში, ნიადაგსა და წყალში Bac. anthracis სწრაფ ინდიკაციას.

ცდების პროცესში პასიური ჰემაგლუტინაციის რეაქციით, ბაქტერიოლგირი გამოკვლევით და ასკოლის რეაქციის გამოყენებით კვლევებში გამოვიყენეთ 130 მსხვილფეხა პირუტყვის ტყავის, 19 მდინარის და ჯილეხზე საეჭვო 391 ნიადაგის ნიმუში (ცხრილი 18).

პასიური ჰემაგლუტინაციის რეაქციის პარალელურად ტყავის სინჯებს ვიკვლევდით ვეტერინარულ პრაქტიკაში დანერგილი პრეციპიტაციის (ასკოლის) რეაქციით.

პასიური ჰემაგლუტინაციის რეაქციაში, დიაგნოსტიკუმად გამოვიყენეთ კომერციული (რუსული წარმოების ჯილეხის იმუნოგლობულინური ერითროციტული დიაგნოსტიკუმი) და ჩვენს მიერ შემუშავებული ჯილეხის სადიაგნოსტიკო ტესტ-სისტემა. პასიური ჰემაგლუტინაციის რეაქცია დავდგით მაკრო – და მიკრო მეთოდით. მიკრომეთოდისათვის გამოვიყენეთ ტაკაჩის აპარატი.

ჩვენს მიერ გამოკვლეული 130 მსხვილფეხა პირუტყვის ტყავის ნიმუშებიდან ყველა შემთხვევა აღმოჩნდა უარყოფითი (კეთილსაიმედო).

პარალელურად ვდგამდით კონტროლებს (დიაგნოსტიკუმის, ანტიგენის, გამოსაკვლევი ექსტრაქტის, განმაზავებელი სითხის). ფირფიტას ფრთხილად ვანჯღრევდით ინგრედიენტების შერევის მიზნით.

პასიური ჰემაგლუტინაციის რეაქციის მსვლელობას ვახდენდით კლასიკური მეთოდით. მიღებული შედეგებიდან 391 ნიადაგის სინჯიდან

371 აღმოჩნდა უარყოფითი, 18 დადებითი.

ბაქტერიოლოგიური გამოკვლევის შემთხვევაში 375 უარყოფით, ხოლო 16 დადებითი შედეგი მივიღეთ.

წყლის ნიმუშების გამოკვლევის შედეგად აღმოჩნდა, რომ, 19 სინჯიდან 18 უარყოფითია, 1 დადებითი. ბაქტერიოლოგიური გამოკვლევისას 19 უარყოფითი.

სადღეისოდ, პრეციპიტაციის რეაქცია ძირითადად გამოიყენება ტყავ-ნედლეულსა და მკვდარი ცხოველების შინაგანი ორგანოების (ელენთა, ღვიძლი, გული) ჯილეხზე გამოსაკვლევად.

ცხრილი 18

ტყავ-ნედლეულის, ნიადაგის და მდინარეთა წყლების გამოკვლევის შედეგები

№	ობიექტის დასახელება	რაოდენობა	პჰრ		ასკოლის რეაქცია		ბაქტერიოლოგიური გამოკვლევა	
			უარყოფითი	დადებითი	უარყოფითი	დადებითი	უარყოფითი	დადებითი
1	ტყავ–ნედლეული	130	130	-	130	-	გ.ა.ჩ	გ.ა.ჩ
2	ნიადაგი	391	373	18	გ.ა.ჩ	გ.ა.ჩ	375	16
3	წყალი	19	18	1	გ.ა.ჩ	გ.ა.ჩ	19	-

შენიშვნა: გ.ა.ჩ-გამოკვლევა არ ჩატარებულა

პასიური ჰემაგლუტინაციის რეაქციით 1,5-3 საათის განმავლობაში აღმოჩენილი ვეგეტატიური ფორმების რიცხვი იყო 50 ათასი მიკრობი /მლ-ში, ხოლო სპორებისა 40 ათასი მიკრობი /მლ-ში.

ცდების ანალიზი გვიჩვენებს, რომ შექმნილია ახალი სადიაგნოსტიკო ტესტ-სისტემა (კიტი)– ჯილეხის ერითროციტული იმუნოგლობულინური დიაგნოსტიკუმი, რომელიც ხასიათდება სპეციფიკურობით და მაღალი მგრძნობელობით. შემუშავებული სადიაგნოსტიკო ტესტ-სისტემის მეშვეობით შესაძლებელია ჯილეხის გამომწვევის აღმოჩენა პათოლოგიურ მასალაში, მათ შორის ტყავ-ნედლეულში და ჯილეხზე საეჭვო გარემო არის ობიექტებში. ტესტ-

სისტემა საშუალებას იძლევა ერთდროულად მრავალ ათეულ სინჯს ჩაუტარდეს რეტროსპექტული ანალიზი Bacillus anthracis –ს გამოსავლენად.

დასკვნები

1. საქართველოში ჯილეხის ახლადაღმოცენებული უცნობი კერების რაოდენობამ (2000-2011 წწ) 22 შეადგინა, მათ შორის 16 აღმოსავლეთში, ხოლო 6 დასავლეთ საქართველოში. ჯილეხზე განსაკუთრებით არაკეთილსაიმედო რეგიონებია: კახეთი (დედოფლისწყაროს რაიონი, საგარეჯოს რაიონი). ქვემო ქართლი (გარდაბნის რაიონში 12 არაკეთილსაიმედო პუნქტია). იმერეთი (თერჯოლის რაიონი 5 არაკთილსაიმედო პუნქტი, სამტრედია – 3; ბაღდადი – 3 წყალტუბო – 4). შედგენილია საქართველოში ჯილეხის ახლადაღმოცენებული კერების რუკა.

2. შემუშვებულია ახალი ეფექტური სადიაგნოსტიკო სტანდარტული ტესტ–სისტემა – ჯილეხის იმუნოგლობულინური (ანტისხეულური) ერითროცი-ტული თხიერი (მშრალი) დიაგნოსტიკუმი ტყავ–ნედლეულში, პათმასალაში (სისხლის შრატი, შინაგანი ორგანოები) და გარემო არის ობიექტებში (ნიადაგი, წყალი და სხვა) ჯილეხის აღმძვრელის გამოსავლენად.

3. სადიაგნოსტიკო ტესტ–სისტმის სპეციფიკურობის და მგრძნობელობის ასამაღლებლად, არასპეციფიკური ანტისხეულების მოსაცილებლად ჯილეხის საწინააღმდეგო ჰიპერიმუნური შრატის ადსორბცია პირველად განხორციელდა B. cereus და B. megatheriumis 18-20 საათიანი კულტურათა სუსპენზიით. შემუშავებულია სპირტული მეთოდით ჰიპერიმუნური შრატიდან იმუნოგლობულინური ფრაქციის მიღების ოპტიმალური პირობები იმუნოგლობულინის ოპტიმალური სასენსიბილიზაციო დოზა 150-160 μg ცილაა, ერითროციტების 5 მლ 2,5 %–იან სუსპენზიაზე.

4. მოდიფიცირებული ტესტ–სისტემის გამოყენებით პასიური ჰემაგლუტინაციის რეაქციაში 1,5-3 საათის განმავლობაში აღმოჩენილი ჯილეხის ვეგეტატიური ფორმების რიცხვმა შეადგინა 20-50 ათასი მლ-ში, ხოლო სპორებისა 40 ათასი მლ-ში. რაც 10-ჯერ აღემატება არსებულ სადიაგნოსტიკო პრეპარატს.

5. პასიური ჰემაგლუტინაციის რეაქცია მგრძნობელობით საგრძნობლად აღემატება პათმასალას, ტყავ-ნედლეულსა და გარემოს ობიექტებში, Bac. anthracis ინდიკაციისათვის დანერგილ პრეციპიტაციის რეაქციას.

6. შემუშავებული ტესტ–სისტემა (Bac. anthracis ინდიკაცია) საშუალებას იძლევა გამოირიცხოს ტყავის ქარხნების, სამშენებლო და სამელიორაციო სამუშოებში დასაქმებული პერსონალის ჯილეხით დაავადება და დროულად გატარდეს ეპიდსაწინააღმდეგო ღონისძიებები.

პრაქტიკული წინადადებები

ჩატარებული სამუშაოების შედეგებიდან გამომდინარე მედიცინასა და ვეტერინარიის ლაბორატორიულ პრაქტიკას ვთავაზობთ:

1. პასიური ჰემაგლუტინაციის რეაქციის დასადგმელად მარტივ, სპეციფიკურ და მაღალმგრძნობიარე, სტანდარტულ სადიაგნოსტიკო ტესტ–სისტემას.
2. პრევენციული ღონისძიებების ჩასატარებლად ახლადჩამოყალიბებული, დღემდე უცნობი არაკეთილსაიმედო კერების რუკას. ჯილეხის აღმძვრელის გაუვნებელსაყოფად (სადეზინფექციო საშუალებების გამოყენების ეფექტურობის მიზნით) არაკეთილსაიმედო კერების (ნიადაგი, წყალი) წყალბადიონთა კონცენტრაციის მაჩვენებლებს.
3. ტყავ–ნედლეულში და გარემოს ობიექტებში პჰრ Bac. anthracis ინდიკაციის სპეციფიკურ და მაღალმგრძნობიარე ტესტ–სისტემას, რომელიც მინიმალურ დროში (1,5–3 სთ), აღმძვრელის აღმოჩენის დიაგნოზის დასმის საშუალებას იძლევა.

დისერტაციის თემაზე გამოქვეყნებული ნაშრომების სია

1. **ლ. ღვალაძე.** ჯილეხის სავაქცინე კულტურების შესწავლა და ეტალონური შრატების შერჩევა. საქართველოს სახელმწიფო აგრარული უნივერსიტეტი. 2009.

2. მ. ნათიძე, ს. რიგვავა, **ლ. ღვალაძე.** Bac. anthracis ექსპრესინდიკაცია სპეციფიკური ფაგის ამპლიფიკაციით და პასიური ჰემაგლუტინაციის რეაქციით. საერთაშორისო კონფერენცია „აგრობიომრავალფეროვნების მდგრადი განვითრება“. 2010.

3. მ. ნათიძე, ს. რიგვავა, **ლ. ღვალაძე.** „ფაგის ტიტრის ზრდის რეაქციით მდინარეთა წყლებში Bac. anthracis ექსპრესინდიკაცია“. საქართველოს სოფლის მეურნეობის მეცნიერებათა აკადემიის მოამბე.

4. **ლ. ღვალაძე** „პასიური ჰემაგლუტინაციის რეაქციით ტყავ-ნედლეულში ჯილეხზე გამოკვლევის შედეგები“. საქართველოს აგრარული უნივერსიტეტი. სამეცნიერო შრომათა კრებული. ტ.4 2009.

5. **ლ. ღვალაძე.** „ჯილეხის სავაქცინე შტამების მახასიათებლები”. საქართველოს სოფლის მეურნეობის მეცნიერებათა აკადემიის მოამბე. 2011.

6. **ლ. ღვალაძე.** „ჯილეხის აღმძვრელის ინდიკაციისათვის ერითროციტული იმუნოგლობულინური დიაგნოსტიკუმის შემუშავება და გამოცდა“. საქართველოს სოფლის მეურნეობის აკადემიის მოამბე. 2011.

7. მ. ნათიძე, თ. ონაშვილი, ს. რიგვავა, **ლ. ღვალაძე.** საქართველოში ჯილეხის ახლადაღმოცენებული კერების ატლასი. თბილისი. 2012.

8. **ლ. ღვალაძე** ზ. ლომთათიძე, ს. რიგვავა, მ. ნათიძე. Bacillus anthracis აღმოსაჩენად გაუმჯობესებული სადიაგნოსტიკო ტესტ-სისტემის შემუშავება. სოხუმის სახელმწიფო უნივერსიტეტი. შრომათა კრებული საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა სერია. 2016 წ. (გადაცემულია გამოსაქვეყნებლად).

9. ს. რიგვავა, მ. ნათიძე, **ლ. ღალაძე,** მ. ბუბაშვილი, დ. გოგიაშვილი. „Способ получения иммуноглобулинового сибиреязвенного эритроцитарного диагностикума“. საქართველოს ინტელექტუალური საკუთრების ეროვნული ცენტრი. 2014.

With-LEPL Sokhumi State University
Faculty of Natural Sciences and Health

With the right of manysckipt

Lali Gvaladze

Improvement of Immunodiagnostic Test-System For the Fast Indication of the Anthrax-Causing Bacterium

Presented for seeking the academic degree of the Doctor of Biology (PhD)

Dissertation Thesis Herald

Tbilisi
2016

The works, stipulated by the theme of the dissertation have been performed in 2000-2014, in the Department of Infectious and Invasive Diseases of the Agrarian University of Georgia, in the Immunology Laboratory of the Tbilisi Eliava Institute of Bacteriophages, Microbiology and Virusology and Ltd "Immunogene".

Head of the Research:	**Zaur Lomtatidze,** Doctor of Biological Sciences, Professor at Sokhumi State University **Sergo Rigvava,** Doctor of Biological Sciences, Professor, Academician of the Medical-Biological Academy
Experts:	**Nona Mikaia,** Academic Doctor of Biology, Associated Professor at Sokhumi State University **Mzia Tsiklauri,** Immunologist at Academician Gudushauri National Medical Center, Academic Doctor of Biology, Professor
Formal Reviewers:	**Ilia Gorozia,** Academic Doctor of Biology, Associated Professor at Sokhumi State University. **Shota Tsanava**, Academic Doctor of Medicine, Associated Professor at Public Health Department of Javakhishvili State University

The dissertation will be defended on 25 November, 2016, at 14:00 at the meetin of the Dissertation Board of the Faculty of Natural Sciences and Health-care of the LEPL Sokhumi State University.

Secretary of the Thesis Council

Academic Doctor of Biology,

Associated Professor at

LEPL Sokhumi State University **Nona Mikaia**

General Characteristics of the Thesis

Anthrax still remains to be the actual problem in the whole world. Deep interest to Anthrax is the reason for the list of health, social-economic and other questions, concerning the nature, pathogenesis, diagnosing, treating-preventing means and etc.

Making a spore by the bacterium and keeping its vitality in the ground for decades, transformation from sporadic form into vegetative, constantly creates the threat of explosion, significantly inhibits the elimination of the bacterium as a biological object [Gavrilov… 2006, Drinks 2009, Hampson…2011].

The special Interest to Anthrax is caused by the possibility of using the Anthrax as a biological weapon.

In 2001-2015, human cases of the Anthrax disease were detected in the territories which had been animal graves earlier. Statistical data show that the number of individuals with Anthrax was 812. In 2000-2011, the number of animals with Anthrax came to 108. Of these, 99 were bovines, 7 – sheep and goats, 1 horse and 1 pig. All the cases of the animals had the lethal outcome.

The abundance of emerging disease focuses (hotbeds) and the intensity of the spread of the disease require the inevitable conduction of the fast, simple and affordable research investigations. The diagnostic, modern methods of Anthrax are expensive and its usage for retrospective investigations is associated with rather high expenses. Therefore, it is extremely challenging to elaborate highly sensitive, specific and economically approved diagnostic test systems.

Goals and Challenges (tasks) of the Study

The goal of the work is to elaborate, test and implement the improved diagnostic serological test systems for fast indication of the Anthrax causing bacteria in water, soil, leather, fur and other objects hence from the actuality of Anthrax disease emerging and spread of the infection.

Taking above into consideration, the research covered the following challenges:

1. Studying the Anthrax epidemiology in 2001-2015, in Georgia;
2. Studying the basic traits to establish stability of the Anthrax vaccinating strains (“STI” $34F_2$) and the species, belonging to the Bacilli group (Bac. cereus, Bac. mesentericus, Bac.subtilis, Bac. mycoides);
3. Elaboration of the improved serological test-systems and its utilization in the reaction of passive hemagglutination;
4. Studying the sensitivity and specificity of the improved test system for Anthrax diagnosing;

5. Investigation of the probes from river water, soil, leather, artificially contaminated by "STI" (the Sanitary Technical Institute) vaccine and bacilli species;
6. Utilization of the improved (updated) test-systems in the white mice, intentionally infected by ''STI'' vaccine;
7. Utilization of the Passive Hemagglutination Reaction (PHR) in the river water, soil and leather for fast indication of the Bac. antracis

Scientific Innovation of the Work

- Unreliable points of Anthrax, described in Georgia, in 2000-2011 and the map, made according to them.

- Improved serological test-system is elaborated for Antrax express diagnosing in river water, soil and leather;

-The Passive Hemagglutination Reaction, offered using Anthrax test-system with its sensitivity, is above the tested, precipitation reaction and is prospective in Medicine and Veterinary, for purposes of scientific and practical application.

- The test-system is Anthrax specific and highly sensitive Erythrocyte Immunoglobuline (antibody) diagnostics, which allows to detect Bac.antracis indication – $2.0x10^3$-$3.0x10^3$ (20-30 thousand units of microbes) in the short time period, within 1.5-3 hours;

Practical Significance of the Work

1. Anthrax incidence dynamics has been studied in Georgia, in 2011-2015;
2. The map of emerging, unreliable focuses of Anthrax has been described, which will help health and veterinary specialists, interested in Anthrax problem to duly and timely make liquidation arrangements of the disease;
3. The elaborated, specific and highly sensitive test-system allows within the short time period (1.5-3 hours), to investigate for Anthrax the pathological material and environmental objects – soil, water, leather and etc. The test system will especially help veterinary specialists to accurately count the cases of Anthrax causing bacteria in leather and provide people and animal safety.
4. By means of elaborated test-system, it is possible to investigate the existence of Anthrax incidence in soil, which is important to establish safety while transiting, meliorating, developing building sites and taking agricultural plots.

The Constitition and the Volume of the Dissertation

The dissertation thesis is presented on 134 pages of the printed text. It consists of the introduction, literature review, description of the utilized materials and methods (approaches), own investigations, discussion of the achieved results, conclusions, practical offers, list of literature. The atlas of the emerged focuses and instruction: "Elaboration of the improved test-systems" are attached with the work (is approved by the Immunogene Scientific Council). The work is illustrated with 18 charts, 4 diagrams, map and 2 schemes. The list of literature covers 155 names.

Investigated Objects and Methods

Investigated material

During the trials, we investigated 191 soil, 19 river and 130 leather samples and microorganism cultures: Bac. Cereus, Bac. Subtilis, Bac. Megatherium, Bac. Anthracoides, Bac. Mycoides, Bac.Mesentericus, Anthrax vaccine "STI" and $34F_2$; In order to check the elaborated test-system, we used 10 white mice, with the live mass of 18-20 g each.

Feeding areas

We used for bacteriological investigation: Soy broth (pH 7.2-7.4), soy agar (pH 7.2-7.4), half-liquid (0.4%) agar, bloody agar, milk, meat-peptone gelatin, colored row of sugars (glucose, fructose, rhamnose, sucrose and dextrin).

Serums for Precipitation

Serums for Anthrax precipitation have been used in experiments, made in Ukraine (series N 2 2008, ''Kherson Biofactory'') and Russian Federation (series N 74, ''Orlov Biofactory'', 2009 and series N 67, 2010 ''Orlov Biofactory'').

Antibiotics

To detect the microbial sensitivity towards the antibiotics, we used in trials commercial Doxycycline, Penicilline, Polymyxine, Trimethoprim and Sulfanilamid medication Sulfadimezin and Bactrim forte's paper discs (manufacturer: Benex Limited, Shannon, County. USA).

Bacteriophage

Phagosensitivity of the microbial species of the Anthrax vaccine strains and Bacilli family was checked by commercial, specific Anthrax ''Gama'' and Fah diagnostic phages. (LTD ''Bacteriophages Biopreparation'' Tbilisi).

Methods

Studying the cultures covered the morphologic (growth features on the feeding areas, hemolytic abilities, staining by Gram rule and etc.), cultural, stating biochemical properties (H2S NH3), antibiotic and phage sensitivity. We defined the concentration of Hydrogen Ions by pH-meter (Seven Easy, Metter Toledo, Switzerland).

Serological Reactions

In raw-leather, soil and water probes and other investigated objects, for better indication of Bac. Anthracis, we used Askold (precipitation) and passive (indirect) Hemagglutination (PHR) Reactions. We utilized Takach apparatus for PHR.

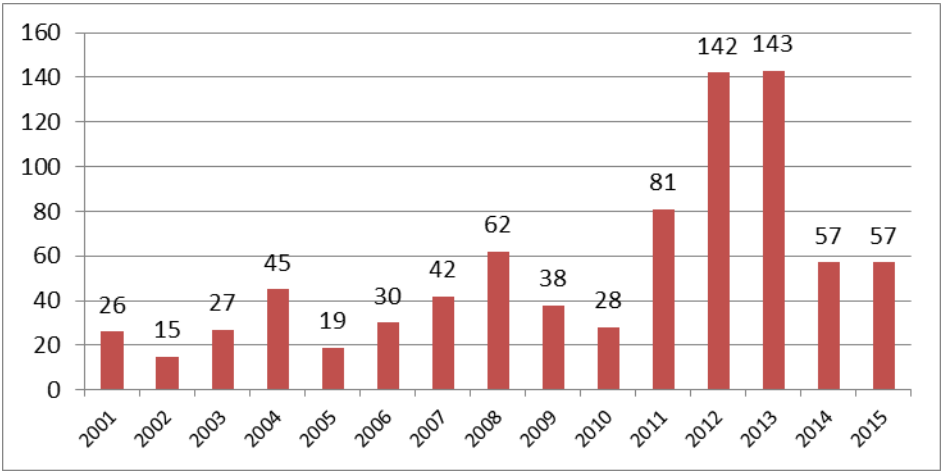
Review of the Investigation Results

Dynamics of affecting humans by Anthrax in Georgia, in 2001-2015

Based on the materials, searched by us, the cases of affecting humans by Anthrax came to 812 (diagram 1, 2).

Diagram 1

Dynamics of Studying the Anthrax Cases in 2001 – 2015 years

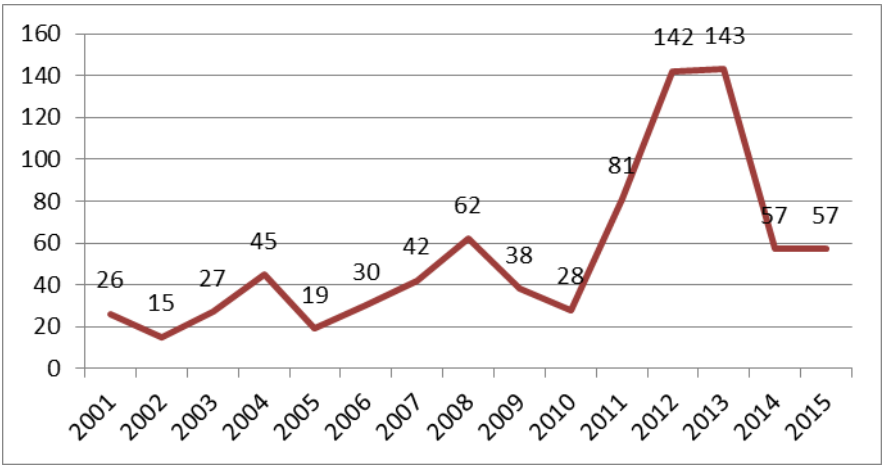


Note: Ordinates – the number of cases

Abscissa – disease cases according to the years.

Diagram 2

Dynamics of Anthrax Cases in 2001 – 2015 years



Note: Ordinates – number of cases

Abscissa – cases of the disease according to the years

As it is seen from the diagram, in 2001 – 2015, out of 812 cases of affecting humans by Anthrax, the disease value is particularly high in 2012 – 2013 (142 – 143 cases). However, in 2002 -2005, the minimal number of cases was described (15 – 19 cases).

In 2000 – 2011, the quantity of the affected animals came to 108 (diagram 1) with lethal outcome in all the cases. The cases of affecting certain species of domestic animals by Anthrax have given the following statistics: 99 heads of cattle, 7 sheep and goats, 1horse and 1pig (schedule 1) (diagram 1).

As it is seen from the schedule, the maximum of Anthrax incidence was detected in 2000 – 15, in 2008 – 12 and in 2011 – 18 cases. The exception is the incidence in 2002, when it is not any Anthrax case registered in agricultural animals. It is worth to point out that based on formal data of 2002, the incidence of animal disease is much lower than the similar value (figure) among the humans, for example, in Kvemo Kartli, Imereti and Samegrelo regions. In that time period, there are no animal cases described. However, 15 cases of human disease are registered.

Schedule 1

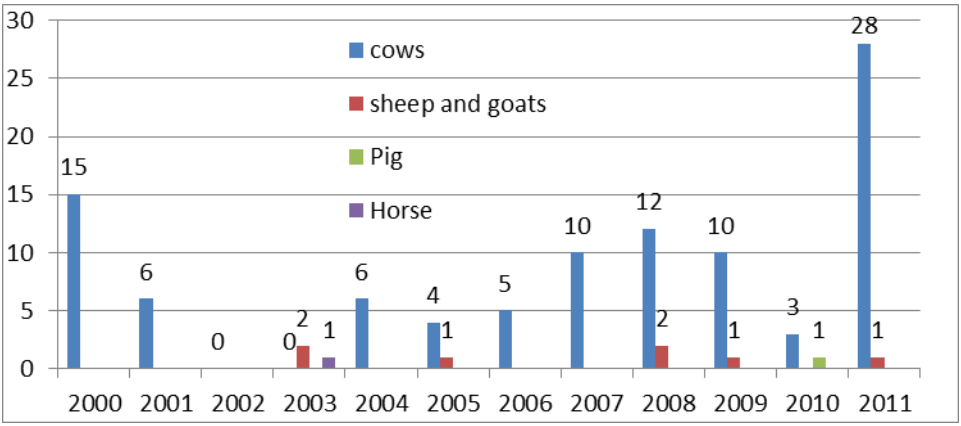
In Georgia, in 2000-2011, the quantity of agricultural animals, affected by Anthrax

№	year	bovine	sheep and goats	pigs	horses
1	2000	15/15*	-	-	-
2	2001	6/6	-	-	-
3	2002	-	-	-	-
4	2003	-	2	-	1/1
5	2004	6/6	-	-	-
6	2005	4/4	1/1	-	-
7	2006	5/5	-	-	-
8	2007	10/10			
9	2008	12/12	2/2		
10	2009	10/10	1/1	-	-
11	2010	3/3	-	-	-
12	2011	28/28	1/1	1/1	-
	Total 108	99/99	7/7	1	1/1

Note: 15/15, out of 15 cases, all 15 died.

Diagram 3

In Georgia, in 2000-2011, Anthrax disease values of agricultural animals



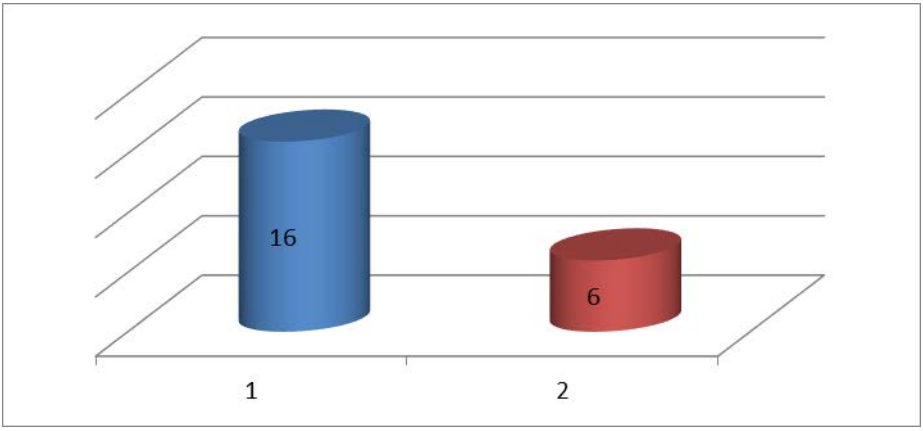
Note: Ordinates – number of animals

Abscissa – disease cases according to the years

In Anthrax Epizootiology, the newly emerged manifesting focuses have particular importance. Based on the materials, searched by us, the number of newly emerged focuses i.e. those, that have never been described, is 22 (map 1). Most of newly emerged focuses are located in Eastern Georgia (16), relatively few – in Western Georgia (6) (diagram 2). Unreliable regions are: Akhalkalaki, Bolnisi, Gardabani, Gali, Dusheti, Zugdidi, Tetritskaro, Tianeti, Marneuli, Ninotsminda, Sagarejo, Samtredia, Kazbegi, Tsageri, Tsalka and Tskaltubo regions.

Diagram 4

Newly emerged, Anthrax manifesting focuses

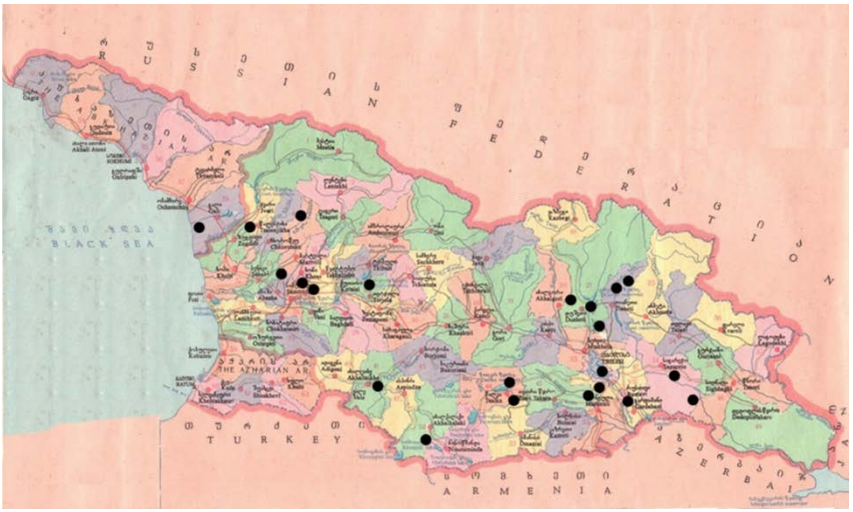


Note: 1. Western Georgia

2. Eastern Georgia

Map 1

Newly emerged focuses of Anthrax in Georgia



Note: ●– the point, fixed on the map is a newly emerged focus

It is well known that the number of factors affect the development of Anthrax causing bacilli. Among them the concentration of Hydrogen Ions (pH) is important. With this in view, during the study, we defined the pH of investigated water and soil samples (schedule 2).

The analysis of the study results showed that the abundance of unreliable points in Eastern Georgia if compared with Western Georgia, is caused by the development of Livestock, existence of soils, rich with the humus and weak alkaline reaction of the soil, which is within pH– 7.6 - 8.6 in investigated regions of Gardabani, Kareli, Akhaltsixe and others and represents the supporting condition for long-lasting microbial vegetation and hence the persistence (see the schedules 2-3).

Schedule 2

The (pH) values (figures) of the Hydrogen Ion concentration of river waters, investigated for Anthrax

#	Rivers	pH
1	Abashis tskali	7,2
2	Alazani	7,2

3	Algeti	8,4
4	Aragvi	8,35
5	East Frone	8,3
6	West Frone	8,3
7	Iori	8,45
8	Liakhvi	7,2
9	Lochini	8,3
10	Mejuda	7,5
11	Mtkvari	7,0
12	Rioni	7,0
13	Suramula	5,8
14	Supsa	6,6
15	Tskhenis Tskali	7,1
16	Dzama	8,35
17	Dzirula	7,35
18	Chailuri	7,15
19	Kvirila	7,15

Schedule 3

pH figures of the soil samples of unreliable points (items) for Anthrax in Georgia

#	District	pH
1	Gardabani district, Berliki	8,2
2	Gardabani district, Lemshveniera	8,15
3	Kareli district, Abisi	7,65
4	Akhaltsikhe district, Tskroma	8,3
5	Dedoflistskaro district, Tsiteltskaro	8,65
6	Kutaisi autofactory area	8,4-7,95
7	Lanchkhuti district, Lesa Shukhuti Japana Chibati	6,25 6,95 5,7 6,25
8	Zugdidi district, Rukhi	6,35
9	Senaki	8,9

Chapter 2

Studying the Stability of Species of the Bacillus family and Anthrax Vaccine Strains /"STI", 34F2/

Hence from the possible changes in Vaccine strains' traits, namely morphological, cultural, tinctorial, sucrosic and other features, we have studied the stability of strains, utilized during the experiment (schedule 4, 5, 6, 7, 8, 9).

For this purpose, we used Anthrax vaccine "STI" and 34F2 strains, as well as the microorganisms of the following species of Bacillus family: Bac.cereus, Bac.megatherium, Bac.subtilis, Bac.mycoides and Bac.mesentericus.

Schedule 4

Morphological and Tinctorial Features of Some Species of Bacillus Family and Anthrax Vaccine Strains

№	Vaccine strains	Gram rule of staining	Spore	Capsule	Movement
1	Bac. anthracis "STI"	+	+	-	-
2	Bac. anthracis 34 F_2	+	+	-	-
3	Bac. cereus	+	+	+	+
4	Bac. megatherium	+	+	-	+
5	Bac. mesentericus	+	+	-	+
6	Bac. subtilis	+	+	-	+
7	Bac. mycoides	+	+	-	+

Note: Anthrax vaccine strains are still, but other species of Bacillus family are movable;

Schedule 5

Cultural Traits of the Bacillus Family Microbes and Anthrax Vaccine Strains

№	Name of Microbe	Growth characteristics			Gelatin swelling
		Brainheart broth	Brainheart agar (Colonies)	Form of colony	
1	Bac. anthracis „ხ$^{\circ}$o”	slight opalescence cotton-like sediment	jellyfish colonies	RO *	upside down fir
2	Bac. anthracis „34 F_2”	Transparent, cotton-like sediment	white-grey lion mane colony	R	„————————”
3	Bac. cereus	film, flakes, Opacities	pale curly colony	R	funnel
4	Bac. megatherium	opacities film	with wrinkled masses	RO	funnel-like
5	Bac. mesentericus	film Opacities	wrinkle-like mucous	S	fir or funnel-like
6	Bac. subtilis	film, flake Transparent	grey-white sometimes brown Wrinkled	R	cylinder-like
7	Bac. mycoides	wrinkled Film	grey-white sometimes brown Wrinkled	R	„————————”

Note: R rough colony; O smooth colony; S mucous

Schedule 6

Enzymatic activity of the microbes, belonging to the Anthrax Vaccine and Bacillus Family

№	vaccine strain	milk clotting	Methylene blue reduction	gelatin hydrolysis	hemolytic activity	H_2S	NH_3
1	Bacillus anthracis „ხმ0”	+*	+	+	-	+	+
2	Bacillus anthracis $34F_2$	+	+	+	-	+	+
3	Bacillus cereus	+	+	+	+	-	+
4	Bacillus megaterium	+	+	+	+	+	+
5	Bacillus mesenterius	+	+	+	+	+	+
6	Bacillus subtilis	+	+	+	+	+	+
7	Bacillus mycoides	+	+	+	+	+	+

Note: + positive reaction; - negative reaction

Schedule 7

Sucrose Properties of the Microbes belonging to the Anthrax Vaccine and Bacillus Family

№	name of the microbe	carbon fermentation					
		Glucose	lactose	sucrose	arabinose	mannitol	starch
1	Bac. anthracis „ხმ0”	A*	-	A	-	-	A
2	Bac. anthracis „34’’ F_2	A	-	A	-	-	A
3	Bac. cereus	A	A	A	A	-	-

4	Bac. megaterium	A	A	A	-	-	A
5	Bac. mesentericus	A	A	A	-	-	A
6	Bac. subtilis	A	A	A	-	-	A
7	Bac. mycoides	A	A	A	-	-	-

Note: “A”- Acid production; “-” Doesn’t produce acid

Schedule 8

Phagosensitivity of Anthrax Vaccine Strains and Other Species of Bacillus Family

№	cultures	Phages	
		Gamma phage	Fah phage
1	B. anthracis,,sti’’	4+*	4+
2	B. anthracis “34 F_2”	4+	4+
3	B. cereus	R*	R
5	B. subtilis	R	R
6	B. megatherium	R	R
7	B. mesentericus	R	R

Note: R- strain is resistant; 4+ is highly sensitive

Schedule N 9

Antibiotic Sensitivity of Other Species of Anthrax Vaccine Strains and Bacillus Family

№	Cultures	Antibiotics					
		Polymyxin	Bactrim Forte	Trimetoprim	Penicillin	Doxycyclin	Sulfadimidin
1	B. anthracis,,sti’’	R*	R	4+	4+	4+	4+

2	B. anthracis,, 34 F_2	R	R	4+	4+	4+	4+
3	B. cereus	3+	4+	R	4+	4+	3+
4	B. subtilis	3+	4+	2+	4+	4+	3+
5	B. megaterium	R	3+	R	4+	4+	R

Note: R-strain is resistant; (the degree of lyses was not revealed),

2+slightly sensitive;

3+moderately sensitive

4+highly sensitive (indicates the full microbial lyses).

The results of the investigation, given in the schedule, reveal that Anthrax vaccine strains, used by us "STI" and 34 F_2 as well as the strains, belonging to the Bacillus Family are the microorganisms with stable traits. They are characterized with typical growth in broth and agar, they don't create the capsule, but form the spore, give R and RO-shaped colonies. They are non-hemolytic and "pearl lace" phenomenon is their characteristic feature (see the schedule N 4, 5, 6, 7). The Anthrax vaccine strains "STI", 34F_2 are sensitive to Penicillin, Trimethoprim and Doxacyclin /4+/, but resistant to Polymyxin and Bactrim Forte. Antibiotic sensitivity of other species of Bacillus family has been just the opposite. Bac.subtilis and Bac.cereus turned to be highly sensitive to Bactrim Forte, Penicillin and Doxycyclin. The same was Bac.megaterium to Penicillin and Doxacyclin. However, was resistant to Sulphadimidine (schedule 8).

The results of the trial (experiment) show that the Anthrax vaccine strain "STI" and 34F_2 are highly sensitive to Gamma and Fah phages, that was reflected in the degree of lyses (schedule 9) and the microbes, belonging to the Bacillus family, which were used in our experiment, are resistant to the above phages.

Chapter 3

Elaborating the Improved Test-system of Anthrax Immunodiagnostics

In our experiments, the initial stage of elaborating the Anthrax diagnostic test-system included selection of high titer precipitation serum. The latter is the inevitable prerequisite to exactly know how high the serum activity is. With this in view, during investigations with passive Hemagglutination reaction (using Anthrax Anti-genetic Diagnosticum), we utilized commercial Anthrax precipitation serums, made in Ukrain (Series N 2 2008) and Russian Federation (series N 72, 2009 and series N 67, 2010). The results of the trial are shown in schedule 10.

Schedule 10

Specific Activity (titer) of Anthrax Hyperimmune Serums

№	Serum name	producing country	titers (phr)
1	Precipitative serum, series 2	Ukraine	1:100.000
2	Precipitative serum, series 74	Russia	1:50.000
3	Precipitative serum, series 67	Russia	1:50.000

As it is seen from the schedule, out of the three precipitative serums, investigated by Hemagglutination reaction, the Ukrainean one had the highest activity (S 2), in which the titer of anti-Anthrax Antibacterial antibodies came to 1:100.000 i.e. in this dilution, we received the positive result, which was significantly higher than the consistence of antibodies in the remaining serums.

It is established that the diagnostic preparation, received from high-titer serums and made by immunoglobuline is more sensitive.

Out of precipitative serums, the globulin was received from serums by spirits method, using Methanol (Dubert at al. 1953). In order to remove the remaining spirits and low molecular admixtures, we performed the purification of the immunoglobuline solution by dialyses (the size of pores of dialyses bag was 10 000 kilodaltons). In order to increase the specificity of preparation, we performed the Anthrax precipitative serum absorption using Bacillus family species of B.cereus and B.megatherium. According to the existing turbidity standard we made 2 billion/ml concentrations of equal volume. 0.1 ml suspension was added to every 1ml of the serum. After shaking, we left it in thermostat

for 15-20minutes at 37 degrees of Celsius. After absorption, we centrifuged with the 6000 turns a minute for 20 minutes. Then we filtered the serum in the sterilizing filter – Millipore (pore size – 0.22μm).

One of the basic stages of the highly sensitive, active diagnostic test-system is the selection of the method of absorbent (erythrocyte) stabilization. With this in view, in our experiment, we utilized different methods of formaldehyde processing of erythrocytes (schedule 11). As it is seen from the schedule, the number of microbes using erythrocytes, processed by the Csimas method, came to 400 thousand (3+), by the Menshov, Shmuter 1978 method it was 100 thousand and by the Maianski at al (1968) method it was possible to detect 25 thousand microbes. Based on the received results, it was revealed that the modified method, elaborated by Maianski at al provides obtaining the highly sensitive, specific test system of Anthrax.

Schedule 11

Studying the Specificity of Erythrocytes, Processed by Specific Methods

#	Formalinization of erythrocytes	number of the detected microbes (thousand)								
		1600	800	400	200	100	50	25	12,5	6
1	Csizmas 1960	+++ *	+++	+++	++	-	-	-	-	-
2	Меньшов, Шмутер 1978	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-
3	Маянский с соавт. 1968	+++	+++	+++	+++	+++	++++	+++	++	-

Note: 4+; 3+ - positive answer (number of the revealed microbes);

2+; - negative answer.

In order to make a diagnosticum, we used to wash the formalinized erythrocytes with 0.9% NaCl solution and resuspended by the same solution (pH=7.0-7.2) and made the erythrocyte 2.5% mass. The amount of erythrocytes in the above suspension was 5-6.10^5 cells. In order to increase the specificity and sensitivity of the ready-made preparation, 5ml 2.5% suspension was added to the equal amount of different dilutions (1:1000; 1:5000; 1:20 000) of Gold acidic Potassium ($K_2CR_2O_7$) and placed it in the thermostat for 20 minutes, at 37 degrees Celsius. We washed the erythrocytes, processed by Potassium Bichromate, by the NaCl 0.9% solution and made the 2.5% suspension. In respect of specificity and sensitivity, the best answer was received by the formalinized Potassium Bichromate in case of 1:5000 dilution.

In order to improve absorptive properties Tanin acid was added to the 5mls of 2.5% suspension of erythrocytes (concentration $2.0x10^4$) in equal amounts and place it into thermostate at 37 degrees Celsius for 20 minutes, then we wash it with 1/15 M phosphate buffer pH=7.2 and once 1/15M phosphate buffer pH=6.4. We perform suspension of the washed erythrocytes by 0.9% solution of NaCl up to 2.5% concentration and add Sensitin – Anti-Anthrax Immunoglobuline.

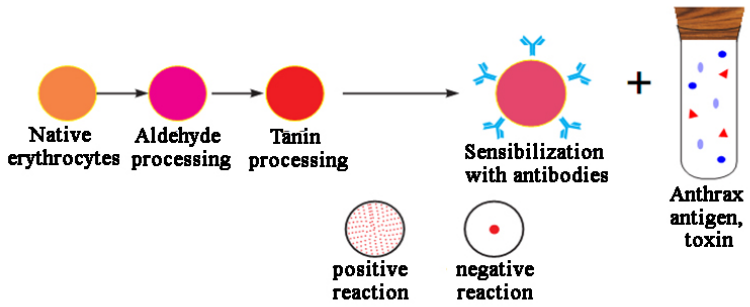
In the process of making the diagnostic test-systems, sensibilization (loading with antibodies) of the erythrocytes, formalinized and processed by Potassium Bichromate has a special importance. The process of erythrocyte sensibilisation with proteins, interaction between the Sensitin and Absorbent is a complex mechanism. Its quantitative characterization is not fully understood so far. It is well known that the optimal hemosensibilization depends on Sensitin concentration, duration of sensibilization and the temperature of the solution, Hydrogen Ion concentration (pH) and etc.

We performed the sensibilization of the erythrocytes, processed by Tanin acid (1:20 000) by the anti-Anthrax Immunoglobuline in thermostate at 37 degrees Celsius for 3 hours, by the periodic shaking of the suspension. Then we placed the mixture in the fridge at +6 +8°C, for 10-16 hours. Half an hour before the completion of the sensibilization, in order to stabilize, we added 1% Formalin to the suspension.

We defined the optimal, sensibilizing dose of Immunoglobuline by the experiment, for which we took different doses of Anthrax (50,80,150, 200mkg proteins for each 1ml 2.5% suspension) for the equal amount of erythrocytes (5ml). By the trials, we found out that the optimal sensibilizing dose of Immunoglobuline is 150-160mkg. Erythrocytes, loaded with this dose are characterized with high sensitivity that was proved by the detection of 20-25 thousand microbial units in the investigated suspension (Anthrax "STI" vaccine).

Scheme 1

Defining the Anthrax antigen in passive Hemagglutination reaction



Using Anthrax Immunoglobuline optimal dose, the diagnostic test-system was made. Its specificity and sensitivity was studied on Anthrax vaccine strains (STI-1 vegetative form; STI-1 sporadic form; $34F_2$ – vegetative form; Anthrax vaccine strain – Ikhtiman vegetative form) and the representatives of the Bacillus family (B.cereus, B.anthracoides, B.thuringiensis, B.megaterium, B.subtilis). The received results are given in the schedule 12.

Schedule 12

Sensitivity and Specificity of Anthrax Diagnostic Test-System

#	Utilized strains	quantity of the detected microbes (thousand)								
		1600	800	400	200	100	50	25	12,5	6
1	STI-1 spore	++++ *	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	+
2	STI-1 vegetative	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+
3	$34F_2$- vegetative	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+
4	B.anthr.Ikhtiman vegetative	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	+
5	B.cereus	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	B.anthracoides	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	B.thuringiensis	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	B.megaterium	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	B.subtilis	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Note: +++ -quantity of the revealed microbes;

++ and – negative answer

As it is seen from the schedule, by means of the elaborated diagnostic test-system it is possible to detect 20-50 thousand "STI" vaccine strains, $34F_2$ and Ikhtiman's microbial vegetative cell and 40-50 thousand STI-1 spore detection. It can be considered as the very positive side of the offered diagnostic test-system, that it gives the negative results with the microbes of the B.cereus family, which proves the specificity of the test-system.

Thus, we can conclude that the elaborated test-system is the highly specific and highly sensitive preparation, which can be used for diagnosing the Anthrax causing Bacillus.

The sensitivity of the test system, elaborated by us, was studied with the similar diagnostic preparation. The results of the investigation are presented in the 13th schedule.

Schedule 13

Sensitivity of Anthrax Diagnostic Test-System

#	Name of the experimental test-system	revealed amount of Anthrax sporadic vaccine (STI-1)	trustworthy difference (P)
1	Test-system, elaborated By the method, prepared by us	17,9±2,5	<0,01
2	Diagnosticum, prepared By Fomicheva and etc. 1971 Method.	192,0±15,0	<0,05

The relative assessment of the elaborated test-system showed its high sensitivity. The trials proved that the test system, elaborated by us, is 10 times more active than the existing similar preparation.

Studying the Specificity of the Anthrax Diagnostic Test-System

The microbes of the Bacillus family (Bac.subtilis, Bac.megaterium, Bac.mesentericus, Bac.mycoides, Bac.cereus), spread in the soil and water are characterized by antigen similarity with Anthrax causing Bacillus. This causes the chance to get the positive, non-specific, false result in investigated objects, in passive Hemagglutination reaction.

Taking the above into consideration, the test-system, received by the proposed technology, was additionally studied for specificity in the objects of artificially contaminated environmental area: soil, water, raw leather.

In parallel regime with passive Hemagglutination reaction, with Askol reaction, we investigated the samples of artificially contaminated leather and soil samples (schedule 14).

Schedule 14

Index Values of the Anthrax Diagnostic Test-system Specificity

№	Name of microbe	specificity			
		Passive hemagglutination reaction		Askol reaction	
1	Bac. anthracis “STI”	+	+	+	+
2	Bac. anthracis 34 F_2	+	+	+	+
3	Bac. cereus	-	-	+	+
4	Bac. megaterium	-	-	-	-
5	Bac. mesenterium	-	-	-	-
6	Bac. subtilis	-	-	-	-
7	Bac. mycoides	-	-	-	-

Note: +reaction is positive; -reaction is negative

The results showed that during the investigation of soil samples, contaminated with Bacillus species, in all the cases, the results proved to be negative which clearly proves the specificity of the utilized test-system (schedule 14). During the precipitation reaction, while counting the results, B.cereus gave the positive result.

At the next stage, the sensitivity of the test-system, elaborated by us was investigated. With this in view, we took the artificially contaminated, following samples: soil, water and raw fur. The defined amount of ‘’STI’’ vaccine spore was introduced into the samples (Schedule 15).

Schedule 15

Samples, Artificially Contaminated by "STI" Vaccine Strain

Quantity of the revealed microbes / Sample	Full quantity of microbes (phr)										
	12.5 mln	6.3 mln	3.65 mln	1.7 mln	850 thouthand	425 thoushand	212 thouthand	106 thouthand	53 thouthand	25.15 thouthan	12 thouthand
Soil	+*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Leather	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Water	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Serum control	-										
Diagnosticum control	-										

Note: +positive,

-negative.

The analysis of the result, received by the test system reaction, showed that in the above objects, the minimal amount of the searched vaccine strains - 20-50 thousand microbial bodies can be detected and in water – up to 10 thousand microbes (during the positive reaction, in penoplastic fossa, the sediments are precipitated in umbrella like manner). In all the probes, where the above listed bacillus family microorganisms were spread, negative answers have been received. The similar result was received when counting the results of Askol or precipitation reaction (schedule 16).

Schedule 16

Results of Investigation by Askol Reaction of Artificially Contaminated Soil, Leather and Water Samples by "STI" Vaccine Strains

Quantity of the detected microbes / Sample	Total number of microbes							
	12.5 mln	6.3 mln	3.65 mln	1.7 mln	850 thouthand	425 thouthand	212 thouthand	106 thouthand
Soil	+*	+	+	+	–	–	–	–
Leather	+	+	+	+	–	–	–	–
Water	+	+	+	+	–	–	–	–
Antigen control	+	+	+	+				

Note: +positive; -negative

The received results revealed that by Askol reaction, it is possible to reveal 2 million and more microbial cells.

The sensitivity of the diagnostic test-system (specific activity) was studied on white mice (schedule 17) whose live mass was 18-20g. In advance, we infected the animals intraperitoneally by one million colony-producing units ($1.0x10^6$) of Anthrax vaccine strain ($34F_2$). After 6hours from vaccine introduction, by Paster pipette, intraorbitally, we took the animal blood samples and separated the serum. We inactivated the complement, for what we heated the serum up to 56^0C.

In order to remove the Hemagglutinin, we performed the serum absorption by the erythrocytes of the same series, which we used to make the diagnosticum (schedule 17).

Schedule 17

Studying the Anthrax Diagnostic Test-System for Sensitivity, Using White Mice

Utilized vaccine	Dosage of the vaccine Intraperitoneally	Investigated organs and results				
		liver *	spleen	serum	lung	kidney
34 F_2	$1{,}0x10^6$ cpu	+	+	+	+	_

Note: CPU – Colony Producing Unit

-+Positive Reaction;

- - Negative Reaction

By the trials, we found out that the positive result i.e. vaccine was detected while investigating the serum, liver, lung and spleen, which proves the presence of the vaccine strain in the above organs.

The negative answer was received by kidney investigation. The received result shows that it is sensible to investigate the animals, suspected for Anthrax utilizing the improved test-system, elaborated by us.

In order to control, we investigated the organs, similar to the healthy animals. In all the results, the negative answer was received.

Investigation of Water, Soil and Pathological Materials by Anthrax Diagnostic Test-System

Research works, stipulated by the dissertation theme, consisted of fast indication of Bac.antracis in raw leather, soil and water.

During the trials with passive Hemagglutination reaction, bacteriological investigation and Askol rection, we used 130 bovine leather, 19 river and 391 soil samples, suspicious for Anthrax (schedule 18).

In parallel regime to passive hemagglutination reaction, we investigated leather probes by precipitation (Askol) reaction, already implemented in veterinary practice.

In passive hemagglutination reaction, we used commercial (Russian production, Anthrax immunoglobuline, erythrocyte diagnosticum) and Anthrax diagnostic system, elaborated by us as a diagnosticum. We performed the passive hemagglutination reaction by macro and micro methods. For micromethod, we used Takachi apparatus.

Out of 130 bovine leather samples, investigated by us, all the cases turned to be negative (reliable).

In parallel regime, we put controls (of diagnosticum, antigen, investigated extract, solution liquid). We shook the plate carefully to mix the ingredients.

We performed the passive hemagglutination reaction by classic method. Out of the received results, of 391 soil probes, 371 turned to be negative, 18 - positive.

In case of bacteriological investigation, we received 375 negative and 16 positive results.

As the result of investigation of water samples, we found that 18 out of 19 probes were negative and 1 was positive. While bacteriological investigation, 19 samples were negative.

For today, the precipitation reaction is mainly used to investigate raw leather and dead animals' internal organs (spleen, liver, heart) for Anthrax.

Schedule 18

Results of Investigation of Raw Leather, Soil and River Waters

№	Name of object	Quantity	phr		Askol reaction		Bacteriological investigation	
			Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive
1.	Raw-leather	130	130	-	130	-	INP	INP
2.	Soil	391	373	18	INP	INP	375	16
3.	Water	19	18	1	INP	INP	19	-

Note: INP-Investigation Not Performed

By passive hemagglutination reaction, the number of vegetative forms during the 1.5 – 3 hours was 20 thousand microbes/ml and spores were 40 thousand microbes/ml.

The trial analyses show that the new diagnostic test-system has been created (kit) – Anthrax Erythrocyte Immunoglobuline Diagnosticum, which is characterized by specificity and high sensitivity. By means of the elaborated diagnostic test-system, it is possible to detect the Anthrax causing bacillus in pathological material, including raw leather and objects in the environmental area, suspicious for Anthrax. The test-system gives the opportunity for retrospective analyses of many tens of probes simultaneously in order to detect Bacillus anthracis.

Conclusions

1. The number of emerging unknown foci of Anthrax (2001-2015) came to 22. Among them, 16 were in the East and 6 – in Western Georgia. The most unreliable regions for Anthrax are: Kakheti (Dedoplistskaro's region, Sagarejo's region). Qvemo qartli (There are 12 unreliable units in Gardabani region). Imereti (Terjola region 5 unreliable units, Samtredia – 3; Bagdadi – 3; Tskaltubo – 4). The map of newly emerged foci of Anthrax is created.

2. New, effective, diagnostic standard test-system is elaborated – Anthrax Immunoglobulin (antibody) erythrocyte liquid (dry) diagnosticum in raw leather, pathological material (blood serum, internal organs) and in the objects of environmental area (soil, water and etc.) to reveal the Anthrax causing bacillus.

3. In order to heighten the specificity and sensitivity of the diagnostic test- system, in order remove non-specific antibodies, the first time absorption of anti-Anthrax hyper immune serum was performed by the suspension of B.cereus and B.megatherium 18-20 hour cultures. Conditions for receiving the immunoglobulin fraction from hyper-immune serum by means of spirits method were defined. Anti-Anthrax immunoglobulin optimal sensibilisation dose (150-160μg protein) was found experimentally for the 5ml 2.5% suspension.

4. Using modified test-system, the number of Anthrax vegetative forms came to 20-50 thousand in ml, in passive hemagglutination reaction in 1.5-3hours and the number of spores was 40 thousand in ml that is 10 times more than the existing diagnostic preparation.

5. The passive hemagglutination reaction is much higher (100 times) with its sensitivity than the precipitation reaction, implemented for Bac.anthracis indication in path.material, raw leather and environmental objects. It's significant, that the specificity of the offered test-system is much higher than the precipitation reaction.

6. The elaborated test-system (Bac.antracis indication) allows the exclusion of Anthrax disease in the personnel of leather factories, building and irrigative works and duly conduction of the anti-epidemic arrangements.

Practical Offers

Hence from the results of the conducted works, we make to Medicine and laboratory practice of Veterinary the following offers:

1. In order to perform the Passive hemagglutination reaction, we offer the simple, specific and highly sensitive, standard diagnostic test-system.
2. In order to perform the preventive arrangements, we offer recently formed, unknown, unreliable foci. In order to neutralize (to make effective the use of means of disinfestion) the Anthrax- causing bacillus, we offer the indices of hydrogen ion concentration of unreliable foci (soil, water).
3. We offer the specific and highly sensitive test-system for indication of Bac.anthracis in raw leather and environmental objects, which in minimal time (1.5-3hrs) allows to diagnose the detection of the Bacillus Anthracis.

The List of Works, Published on the Theme of Dissertation

1. L. Gvaladze. Studying the Anthrax Vaccine Cultures and the Selection of Model (Etalon) Serums, Georgian State Agrarian University, 2009;
2. M. Natidze, S. Rigvava, L. Gvaladze. Express-indication of Bac.anthracis by means of Special phage amplification and passive hemagglutination reaction. International Conference "Sustainable Development of Agro-bio-variety", 2010;
3. M. Natidze, S. Rigvava, L. Gvaladze. "Express-indication of Bac. Anthracis In River Waters by Phage Titer Growth Reaction", "Moambe" of Georgian Agricultural Academy of Sciences";
4. L. Gvaladze. "Passive Hemagglutination Reaction for the Results of Anthrax Investigation in Raw Leather", Georgian Agrarian University, The collection of scientific works, volume 4, 2009;
5. L. Gvaladze. "Characteristics of Anthrax Vaccine Strains", "Moambe" of Georgian Agricultural Scientific Academy, 2011;
6. L. Gvaladze. "Elaboration and examination of Erythrocyte Immunoglobulin Diagnosticum", "Moambe" of Georgian Agricultural Academy, 2011;
7. M. Natidze, T. Onashvili, S. Rigvava, L. Gvaladze. Atlas of Newly Emerged Foci in Georgia, Tbilisi, 2012;
8. L. Gvaladze, Z. Lomtatidze, S.Rigvava, M. Natidze. "Elaboration of Improved Diagnostic Test-system for Bac.Anthracis Detection", Sokhumi State University, collection of works, series of Natural Sciences, 2016 (is referred to be published);
9. S. Rigvava, M. Natidze, L. Gvaladze, M. Bubashvili, D. Gogiashvili. "Means for Getting the Immunoglobulin Anthrax Erythrocyte Diagnosticum", The National Center of Georgian Intellectual Property, 2014.