

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ  
ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА**

ФКУЗ «Иркутский ордена Трудового Красного Знамени  
научно-исследовательский противочумный  
институт Сибири и Дальнего Востока»

**ЭКСПРЕСС- И УСКОРЕННЫЕ МЕТОДЫ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ  
ИНДИКАЦИИ ПАТОГЕННЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ АГЕНТОВ**

Учебно-методическое пособие  
для слушателей курсов профессиональной  
переподготовки и повышения квалификации

Иркутск  
2025 г.

УДК 005.1  
ББК 65. 9920

Авторы-составители:

Загоскина Т.Ю., Колесникова О.Б., Долгова Т.М.,  
Гаврилова О.В., Старикова О.А., Миронова Л.В., Сидорова Е.А.,  
Витязева С.А., Хунхеева Ж.Ю., Кравец Е.В., Мазепа А.В.,  
Таликина Т.О., Балахонов С.В.

Экспресс- и ускоренные методы специфической индикации патогенных биологических агентов. Учебно-методическое пособие. – Иркутск, 2025. – 150 с.

ISBN 978–5–6054556–7–7

Учебно-методическое пособие включает характеристику и описание использования экспресс- и ускоренных методов для проведения специфической индикации возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, опасных инфекционных болезней неустановленного систематического положения, а также ботулинического токсина и стафилококкового энтеротоксина В. Предназначено для обучения слушателей курсов профессиональной переподготовки и повышения квалификации по программам ДПО, может быть использовано специалистами, занимающимися лабораторной диагностикой опасных инфекционных болезней.

Рецензенты:

*Ярыгина М.Б.* – врач-эпидемиолог отдела микробиологии чумы, к.м.н.  
*Григорьевых А.В.* – м.н.с. отдела микробиологии чумы

## СОДЕРЖАНИЕ

Перечень сокращений и условных обозначений .....	5
Введение .....	6
Номенклатура и объем исследований .....	8
Принципы специфической индикации патогенных биологических агентов (ПБА) .....	8
Методы специфической индикации .....	12
Перечень дополнительных методов индикации и идентификации ПБА в центрах индикации .....	13
Выдача ответов по результатам индикации и идентификации .....	14
Требования биологической безопасности при проведении исследований .....	15
Схема специфической индикации ПБА .....	16
Индикация ПБА с использованием иммуносерологических и молекулярно-генетических методов. Индикация ПБА методом флуоресцирующих антител (МФА) .....	17
Реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации (РНГА) .....	26
Иммуноферментный анализ (ИФА) .....	28
Иммунохроматографический анализ (ИХА) .....	30
Индикация ПБА с использованием ПЦР .....	33
Специфическая индикация ботулинических токсинов (БТ) .....	39
Специфическая индикация стафилококкового энтеротоксина В (СЭВ) .....	41
Специфическая индикация возбудителя чумы .....	41
Специфическая индикация возбудителя холеры .....	58
Специфическая индикация возбудителя сибирской язвы .....	65
Специфическая индикация возбудителя туляремии .....	77
Специфическая индикация возбудителя бруцеллеза .....	84
Специфическая индикация ПБА неустановленного систематического положения .....	91
Порядок организации и проведения работ в лабораториях центров индикации и диагностики возбудителей опасных инфекционных болезней при индикации ПБА неустановленного систематического положения .....	93
Индикация возбудителей, обуславливающих синдром острой геморрагической лихорадки .....	95

Индикация возбудителей, обуславливающих синдром острой диареи, геморрагических гастроэнтеритов и энтероколитов .....	97
Индикация возбудителей, обуславливающих острый дерматологический синдром .....	99
Индикация возбудителей, обуславливающих острый неврологический синдром.....	101
Индикация возбудителей, обуславливающих острый респираторный синдром.....	102
Индикация возбудителей, обуславливающих острый желтушный синдром .....	103
Индикация возбудителей, обуславливающих острый офтальмологический синдром .....	104
Индикация возбудителей, обуславливающих «системный» синдром .....	105
Порядок исследования проб объектов окружающей среды при преднамеренном использовании патогенных биологических агентов.....	107
Индикация неизвестных патогенных биологических агентов в объектах окружающей среды .....	108
Порядок организации и проведения работ при индикации и идентификации возбудителей вирусных инфекционных болезней...	109
Приложение 1. МУ 1.3.2569-09. Забор материала на исследование от человека, животных, насекомых и объектов окружающей среды насекомых и объектов окружающей среды.....	110
Приложение 2. МУ 1.3.2569-09. Порядок обработки и обеззараживания исследуемого материала, содержащего (подозрительного на содержание) микроорганизмы I-IV групп патогенности, при проведении работ с использованием амплификационных технологий.....	124
Препараты и тест-системы для специфической индикации опасных инфекционных болезней (таблица) .....	127
Использованные инструктивно-методические документы .....	148

## ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АГ – антиген  
АТ – антитело  
АСМ – атомно-силовая микроскопия  
БМБ – бокс микробиологической безопасности  
БП – биопроба  
БСА – бычий сывороточный альбумин  
БТ – ботулинический токсин  
ВКО – внутренний контрольный образец  
ЗФР – 0,9 % раствор хлорида натрия, pH 7,0-7,6  
ИИХЭ – индикаторный иммунохроматографический элемент  
ИФА – иммуноферментный анализ  
ИХА – иммунохроматографический анализ  
МФА – метод флюоресцирующих антител  
НКС – нормальная кроличья сыворотка  
НЛС – нормальная лошадиная сыворотка  
НМФА – непрямой метод флуоресцирующих антител  
ОК – отрицательный контроль  
ОКВ – отрицательный контроль выделения  
ОСО – отраслевой стандартный образец мутности  
ПБА – патогенные биологические агенты  
ПВ – пептонная вода  
ПХМ – помет хищных млекопитающих  
ПХП – погадки хищных птиц  
ПЦР – полимеразная цепная реакция  
РАО – реакция аггломерации объемная  
РА – реакция агглютинации  
РИВ – реакция иммобилизации вибрионов  
РНГА – реакция непрямой гемагглютинации  
РНАТ – реакция нейтрализации антител  
РТНГА – реакция торможения непрямой гемагглютинации  
СЕ – сывороточные единицы  
СМС – синтетическое моющее средство  
СЭВ – стафилококковый энтеротоксин В  
ФБР – 0,01 % натрий-фосфатныйбуфер, pH 7,4  
ФСБ-Т – фосфатно-солевой буфер, содержащий 0,05 % Твина 20  
ЧС – чрезвычайная ситуация  
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота  
Ig – иммуноглобин

## ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия отмечается тенденция роста чрезвычайных ситуаций (ЧС) санитарно-эпидемиологического характера, обусловленных последствиями природных и техногенных катастроф, появлением и быстрым распространением новых и вновь возникающих инфекционных болезней, а также расширением ареала распространения уже известных инфекционных заболеваний. Сохраняется угроза применения патогенных биологических агентов (ПБА) в биотеррористических целях. В таких ситуациях важной составляющей мероприятий, направленных на обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения, является лабораторная диагностика инфекционных болезней и специфическая индикация их возбудителей.

В ходе реализации мероприятий федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009-2014 гг.)» произошла существенная модернизация лабораторной и производственной базы ряда учреждений Роспотребнадзора, что способствовало широкому внедрению в практику передовых диагностических технологий, в том числе и для проведения специфической индикации ПБА. Одним из аспектов модернизации лабораторной базы стало совершенствование нормативно-методического обеспечения проведения лабораторной диагностики инфекционных болезней, основные положения и принципы функционирования которой регламентированы приказами Роспотребнадзора от 01.12.2017 г. № 1116 «О совершенствовании системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации» и № 285 от 15.04.2024 г. «О внесении изменений в приказ от 01.12.2017 г. № 1116». Весьма значимое место в этом вопросе заняла разработка алгоритмов проведения специфической индикации возбудителей опасных инфекционных болезней.

Ускоренное обнаружение и распознавание природы патогенных микроорганизмов и их токсинов обеспечивает своевременное проведение общей и специфической экстренной профилактики, введение ограничительных мер, а также проведение других профилактических и противоэпидемических мероприятий, направленных на предупреждение возникновения и распространения инфекционных заболеваний.

Методы экспресс-диагностики инфекционных болезней до недав-

него времени развивались, главным образом, на основе классических схем микробиологического анализа, который сводится к выделению чистой культуры возбудителя с последующей его идентификацией по биохимическим, тинкториальным, антигенным и другим характерным свойствам. Многоэтапность этих анализов обуславливает их длительность и практически исключает экспрессность, удовлетворяющую эпидемиологической и клинической практике. Длительность микробиологического анализа составляет, как минимум, несколько дней.

Основные объективные требования к экспрессным методам диагностики инфекционных заболеваний сводятся к следующему: 1. Получение результатов анализа в максимально короткие сроки (часы, идеально – минуты); 2. Возможность проведения и завершения анализа без выделения искомого микроорганизма в чистой культуре при использовании только нативного материала, в крайнем случае, – с привлечением селективных биосред для быстрого накопления возбудителей; 3. Высокие специфичность и чувствительность, как предпосылки надлежащей достоверности анализа; 4. Высокая производительность, простота, доступность и воспроизводимость применяемых методов исследования.

В последние годы развитие новых диагностических технологий, внедрение в практику современных препаратов и автоматических микробиологических анализаторов позволяет существенно сократить время проведения индикации и идентификации, расширить спектр выявляемых микроорганизмов, повысить качество и надежность исследований.

Имеется несколько определений термина «специфическая индикация». На сегодняшний день этот термин подразумевает, в первую очередь, проведение исследований, направленных на установление видовой (родовой) принадлежности возбудителей инфекционных болезней в максимально короткие сроки. Так, в книге «Термины и определения» (Шкарин В.В., Благодирова А.С., 2010) под индикацией микроорганизмов понимается «комплекс мероприятий, направленных на обнаружение в объектах окружающей среды (воздух, вода, почва, поверхности сооружений и предметов) бактерий, грибов, риккетсий, вирусов, бактериальных токсинов (или их маркеров), патогенных для людей и животных».

Специфическая индикация (СИ) предполагает установление этиологических факторов опасных инфекционных болезней в т.ч. с тяжелым клиническим течением и (или) неясной клинической картиной, возбудителями которых могут быть как известные патогены, вызыва-

ющие опасные инфекционные заболевания, требующие проведения мероприятий по санитарной охране территории РФ, так и микроорганизмы неустановленного систематического положения (новые, ранее неизвестные). Вместе с тем, СИ проводится при террористических актах с применением ПБА, включая токсины растительного, бактериального и животного происхождения.

Для индикации ПБА традиционно используют методы экспресс- и ускоренной диагностики: полимеразную цепную реакцию (ПЦР), метод флуоресцирующих антител (МФА), иммуноферментный (ИФА), иммунохроматографический анализы (ИХА), реакцию непрямой гемагглютинации (РНГА), а также реакцию биологической нейтрализации токсина на лабораторных животных. По чувствительности, специфичности, воспроизводимости результатов, безопасности и скорости проведения исследования они превосходят другие приемы микробиологического экспресс-анализа и, дополняя друг друга, позволяют дать обоснованный положительный ответ до выделения чистой культуры и ее полной идентификации.

## НОМЕНКЛАТУРА И ОБЪЕМ ИССЛЕДОВАНИЙ

Лаборатории Центров индикации ПБА осуществляют индикацию возбудителей опасных инфекционных болезней бактериальной, вирусной, паразитарной, микотической и риккетсиозной природы I-IV групп патогенности, выделение и идентификацию культур микроорганизмов бактериальной (I-IV групп патогенности) и вирусной (II-IV групп патогенности) природы для решения следующих задач:

- установления этиологического фактора инфекционных заболеваний в целях предупреждения или ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций, предупреждения завоза и распространения опасных инфекционных болезней на территории субъектов Российской Федерации;
- установления этиологического фактора опасных инфекционных болезней бактериальной и вирусной природы с тяжелым клиническим течением и (или) неясной клинической картиной, возбудителями которых могут быть микроорганизмы неустановленного систематического положения.

## ПРИНЦИПЫ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИНДИКАЦИИ ПАТОГЕННЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ АГЕНТОВ

В работе лабораторий разного уровня, проводящих исследования

по схеме специфической индикации, должны соблюдаться следующие принципы:

- использование единой комплексной схемы анализа, предусматривающей последовательное выявление или исключение маркеров различной природы;

- использование принципа двухэтапного исследования материала (нативного и после биологического накопления) после исключения наличия маркеров вирусов I-II групп патогенности с использованием методов экспресс-анализа, ускоренной диагностики;

- использование единых методов исследования и зарегистрированных в установленном порядке диагностических препаратов (при их отсутствии допускается использование коммерческих незарегистрированных препаратов или экспериментальных производственных серий);

- для получения наиболее достоверных результатов исследования – целесообразность использования двух-трех методов исследования, либо подтверждение результата на наборах разных производителей (серий);

- регистрация каждого вида клинического материала и проб окружающей среды индивидуально, с использованием сквозной нумерации проб;

- единая схема передачи информации о результатах индикации (выдача протоколов с результатами исследований на бумажном носителе с подписями ответственных лиц);

#### **Материалами для взятия проб служат:**

- воздух из приземного слоя,
- осколки и содержимое боеприпасов,
- подозрительные капли жидкости и порошкообразные вещества,
- вода и снег,
- смывы с открытых поверхностей,
- пробы пищевых продуктов и фуража при прямом подозрении на инфицирование,
  - насекомые, грызуны,
  - материал от инфицированных людей (животных) с ориентированием на ведущий синдром болезни (смывы из полости носа и ротоглотки, мазки из полости носа и ротоглотки, носоглоточное отделяемое, смывы с кожных покровов зараженных, а также кровь, содержимое везикул, пустул, язв, бубонов, СМЖ, моча, испражне-

ния, ректальные мазки, рвотные массы, желчь и др. материалы от внезапно заболевших лиц),

- секционный материал от трупов людей и животных, погибших от инфекционного заболевания (головной мозг, мозговые оболочки, лимфатические узлы, фрагменты и содержимое кишечника, фрагменты печени, почки, селезенки, поджелудочной железы, мезентериальные лимфатические узлы).

Забор материала осуществляют с использованием укладки универсальной (комплекта медицинского для забора проб) в присутствии и под руководством специалистов, подготовленных по вопросам диагностики особо опасных инфекций, обученных правилам биологической безопасности при работе с материалом, подозрительным на заражение возбудителями инфекционных болезней I-II групп патогенности, окончивших соответствующие курсы профессиональной переподготовки, или специалистов противочумных учреждений. Тип костюма (средства индивидуальной защиты – СИЗ) определяется группой патогенности возбудителя; при подозрении на неизвестный возбудитель – в противочумном костюме I типа (или его аналогов).

Образцы отбирают в герметично закрывающиеся промаркированные стерильные контейнеры или пробирки (при необходимости, с транспортными средами), соответствующие требованиям санитарных правил (п.524 СанПиН 3.3686-21), с использованием стерильных одноразовых инструментов. Емкости с образцами обрабатывают снаружи дезинфицирующим раствором, герметизируют парафинизированной пленкой (парафилмом), помещают в полиэтиленовый пакет с застежкой. Затем упаковывают с соблюдением принципа «тройной» упаковки. Для этого первичные контейнеры помещают внутрь дополнительного пластикового (металлического) контейнера с завинчивающейся крышкой (вторичный контейнер), в котором находится адсорбирующий влагу материал (марля, вата), в количестве, достаточном для впитывания всей жидкости в случае повреждения первичного контейнера. Вторичный контейнер помещают во внешний (третичный) контейнер – герметичный кейс, который используется для защиты вторичного контейнера. При необходимости упакованная проба может быть помещена в транспортную сумку с хладоэлементом; образцы печатают и пересылают в лабораторию нарочными в срок не более 2,5-3 часов с момента взятия проб, используя различные виды транспорта (самолет, вертолет, автомобиль, поезд). В со-

проводительной записке-направлении должны содержаться следующие данные: куда и кому направляется проба; название материала (пробы); если это клинический или секционный материал – указывают личные данные больного, трупа; место взятия, время взятия пробы (месяц, число, время суток); основание для отбора проб (общие внешние признаки применения ПБА, результаты неспецифической индикации, появление больных людей или животных и т.д.); цель исследования; должность; фамилия и подпись лица, производящего отбор проб; способ доставки материала в лабораторию; где, когда и как консервирован материал; время доставки материала в лабораторию (число, часы суток); должность, фамилия и подпись лица, принявшего пробу. Сопроводительные документы составляются в двух экземплярах и включают: сопроводительное письмо, подписанное руководителем организации, направившей пробы, направление на исследование, акт упаковки и акт передачи. Один экземпляр документов отправляется вместе с образцами в лабораторию (прикрепляется к наружной стенке контейнера (кейса) для транспортирования ПБА или вкладывается в специальный отсек кейса). Второй (копия) остается у лица, направляющего пробы на исследование.

Проведение специфической индикации предусматривает формирование в лаборатории определенных функциональных групп, обеспечивающих исследование по единой схеме, наличие оснащенных рабочих мест и соответствующего оборудования, соблюдение сотрудниками санитарно-эпидемиологических требований к обеспечению безопасности при работе с ПБА в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Необходимость продолжения исследования проб классическими микробиологическими и вирусологическими методами после окончания сроков специфической индикации определяет санитарно-противоэпидемическая комиссия, исходя из эпидемиологических и методических возможностей, когда требуется окончательное заключение о наличии или отсутствии в пробе ПБА, с целью определения чувствительности выделенной культуры к антибиотикам и другим химиотерапевтическим препаратам, для оценки патогенных свойств культур. По результатам бактериологического (вирусологического) анализа оформляют дополнительный протокол.

## МЕТОДЫ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИНДИКАЦИИ

Согласно МР 3.1.0129-18 «Порядок организации и проведения индикации патогенных биологических агентов, в том числе неустановленного систематического положения», обязательными методами специфической индикации являются МФА, ПЦР, ИФА и РНГА. При наличии иммунохроматографических элементов – ИХА.

**МФА** – метод экспресс-диагностики, сочетает иммунологическое и морфологическое исследование. Высокоспецифичный метод, чувствительность составляет  $1 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  м.к./мл пробы. Для специфической индикации используют прямой метод флуоресцирующих антител с контрастированием неспецифического свечения альбумином, меченым производными родамина. Непрямой метод применяют для идентификации культур возбудителей или выявления специфических антител.

**ПЦР** – метод ускоренной диагностики, основан на многократном избирательном копировании мишени ДНК под действием ферментов. Метод высокоспецифичен и высокочувствителен:  $1 \times 10^3$  –  $1 \times 10^4$  м.к./мл. С помощью ПЦР выявляются генетические маркеры бактерий, вирусов, грибов, а также ПБА с измененными фенотипическими свойствами. Для проведения анализа не требуется предварительного обогащения исследуемого материала.

**ИФА** – метод ускоренной диагностики, характеризуется высокой чувствительностью  $5 \times 10^4$  –  $1 \times 10^5$  м.к./мл, специфичностью и экспрессностью. Позволяет выявлять антигены и антитела к возбудителям инфекционных болезней. Определение соотношения IgM и IgG и авидность IgG позволяют дифференцировать острую и хроническую формы заболевания.

**РНГА** – метод ускоренной диагностики, чувствительность составляет  $1 \times 10^5$  –  $1 \times 10^6$  м.к./мл возбудителей опасных инфекционных агентов,  $\geq 50$  мкг/мл токсинов. Позволяет выявлять антигены (при необходимости, – антитела к возбудителям инфекционных болезней). Для реакции используют коммерческие эритроцитарные иммуноглобулиновые диагностикумы.

**ИХА** – экспресс-метод диагностики предназначен для выявления антигенов возбудителей и специфических иммуноглобулинов. Чувствительность от 20 нг/мл до 1 мкг/мл, в зависимости от вида токсина,  $10^6$ - $10^7$  м.к./мл – для возбудителей опасных инфекционных болезней.

Специфическая индикация ПБА данными методами проводится

как в нативных пробах материала (в зависимости от вида проб: в собственно нативных пробах, в нативных пробах после перевода в жидкую фазу или после концентрирования), так и в биологически обогащенных пробах материала (после культивирования на питательных средах, постановки биопробы).

При индикации ПБА наиболее достоверные результаты исследования получают при одновременном (параллельном) использовании двух-трех методов (ПЦР и МФА; МФА и РНГА + ИХА; МФА + ИФА и т.д.). При возможности проведения только одного метода индикации для детекции возбудителя целесообразно исследование данным методом повторить с использованием препаратов разных производителей (серий) или направленных на выявление различных мишеней.

#### ПЕРЕЧЕНЬ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫХ МЕТОДОВ ИНДИКАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ПБА В ЦЕНТРАХ ИНДИКАЦИИ

**Масс-спектрометрия (МС)** – с 2014 года, согласно МР 4.2.0089-14 «Использование метода времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS), введен в лабораторную практику метод MALDI-TOF MS для индикации и идентификации возбудителей I - II групп патогенности», позволяющий идентифицировать бактерии путем сравнения масс-спектров белков бактериальных клеток (рибосомальные и др. белки, пептиды, олигонуклеотиды) с эталонными спектрами, хранящимися в базе данных. Полученный в МС-анализе результат – спектральный сигнал – представляет собой рассортировку заряженных частиц по значению отношения молекулярной массы иона к его заряду. Использование в качестве исследуемого образца чистой культуры микроорганизма или его экстрактов позволяет получить спектр, характеризующий качественный молекулярный состав исследуемого объекта. Получаемый спектральный паттерн является уникальной видо-, а в некоторых случаях и штаммо-специфичной характеристикой, позволяющей однозначно идентифицировать микроорганизм до вида, а в некоторых случаях осуществить и внутривидовую дифференциацию или определить дополнительные свойства микроорганизма, в том числе и клинически значимые.

**Фрагментарное секвенирование** – метод определения нуклеотидной последовательности участков генома микроорганизмов с помощью технологии капиллярного электрофореза. Для идентификации

ПБА бактериальной природы используют секвенирование фрагмента или полной последовательности гена 16S рРНК или других генов «домашнего хозяйства»; микозов – D2 региона гена 28S рРНК (компонент большой субъединицы рибосом); вирусов – консервативных участков генома. Для проведения анализа, где в качестве ДНК-мишеней выбраны ген 16S рРНК и D2 регион гена 28S рРНК, могут быть использованы коммерческие наборы реагентов и базы данных нуклеотидных последовательностей данных участков. Метод характеризует высокая специфичность.

**Полногеномное секвенирование** – метод определения нуклеотидной последовательности всего генома прокариотических и эукариотических организмов, принцип которого основан на массовом одновременном секвенировании тысяч фрагментов ДНК- и РНК-библиотек. Сравнительный анализ геномных данных с последовательностями, хранящимися в международных и национальных базах данных нуклеотидных последовательностей, позволяет идентифицировать ПБА на основании выявления уникальных генетических детерминант. Метод характеризует высокая специфичность.

**Риботипирование** – метод идентификации микроорганизмов, основанный на анализе полиморфизма длин рестрикционных фрагментов генов, кодирующих рибосомальные РНК (рРНК). Для проведения анализа может быть использована автоматизированная система РибоПринтер и база данных рибопринтеров, специфичных для широкого круга микроорганизмов. Метод характеризует высокая специфичность.

**Морфометрический анализ** – измерение геометрических размеров клеток микроорганизмов с помощью метода атомно-силовой микроскопии (АСМ). Морфометрический анализ позволяет идентифицировать ПБА на основании различий в морфологии и поверхности клеток и наличия субклеточных структур.

#### ВЫДАЧА ОТВЕТОВ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ИНДИКАЦИИ

- Предварительный положительный ответ может быть выдан на основании положительных результатов исследования нативного материала с помощью экспресс- и ускоренных методов при обнаружении ПБА через 2-6 часов при использовании МФА, ИФА, РНГА, 6-8 часов – ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени, 8-12 часов – ПЦР с электрофоретической детекцией результатов. Пред-

варительный ответ может быть дан как в случае положительных результатов по всем используемым методам, так и при получении положительных результатов в одном-двух методах.

- При получении в ходе анализа дискордантных (несогласованных) результатов предварительный положительный ответ не выдают, проводят повторное исследование исходного нативного материала (для исключения ошибок на всех этапах исследования, включая подготовку проб).

- При получении несовпадающих результатов в случае использования разных методов индикации вопрос о выдаче предварительного ответа решается в каждом случае отдельно с учетом чувствительности метода и эпидемических предпосылок.

- При получении отрицательных результатов исследований нативного материала методами экспресс- и ускоренной диагностики выдают предварительный отрицательный ответ, исследование продолжают.

- Окончательный ответ выдают после подтверждения результатов экспресс- и ускоренной диагностики на базе Референс-центра по соответствующей нозологии или Центра верификации диагностической деятельности.

По результатам исследования материала оформляют протокол исследования.

Информация о результатах исследования передается в учреждение, направившее материал, в Управление Роспотребнадзора по субъекту Российской Федерации, Федеральную службу по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

## ТРЕБОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИССЛЕДОВАНИЙ

Проведение исследований по специфической индикации ПБА осуществляется на основании СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». Все виды работ с необеззараженным материалом проводят в БМБ III или БМБ II класса защиты с использованием средств индивидуальной защиты в соответствии с действующими санитарно-эпидемиологическими правилами по безопасности работы с микроорганизмами I-IV групп патогенности.

Пробоподготовку, обеззараживание исследуемых проб, выделе-

ние ДНК/РНК, постановку амплификации и электрофорез (в случае электрофоретического учета результатов ПЦР) осуществляют в соответствии с МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» (Приложение 2).

Выделение ДНК/РНК для проведения ПЦР из проб клинического материала, подозрительного на зараженность неизвестным ПБА, осуществляют методом, предусмотренным для обработки материала, инфицированного (подозрительного на инфицирование) вирусом натуральной оспы. При исследовании проб из объектов окружающей среды готовят две аликвоты. Из первой аликвоты выделение ДНК/РНК проводят методом, предусмотренным для обработки материала, инфицированного (подозрительного на инфицирование) вирусом натуральной оспы. После исключения наличия в материале вирусов I группы патогенности из второй аликвоты проводят выделение ДНК/РНК методом, предусмотренным для обработки материала, инфицированного (подозрительного на инфицирование) бактериями II-IV групп патогенности, образующими споры.

Дезинфицирующие средства используют в соответствии с действующими санитарно-эпидемиологическими правилами по безопасности работы с микроорганизмами I-IV групп патогенности.

### СХЕМА СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИНДИКАЦИИ ПБА

Для проведения специфической индикации приняты сокращенная и расширенная схемы исследования, основанные на единых принципах и методах анализа. Различия между ними определяются целями и объемом работы.

При индикации по расширенной схеме все поступающие в лабораторию пробы исследуют на наличие возбудителей бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллез, сеп, мелиоидоз); возбудителей риккетсиозов (Ку-лихорадка, сыпной тиф, лихорадка Скалистых гор, лихорадка цуцугамуши); возбудителей вирусных заболеваний (арбовирусные инфекции группы А (венесуэльский и другие энцефалиты лошадей) и В (вирусы комплекса клещевого энцефалита, японского энцефалита, желтой лихорадки и др.), а также возбудителя пситтакоза, возбудителей глубоких микозов (кокцидиомикоза, нокардиоза, гистоплазмоза) и токсина ботулизма.

Этот перечень биологических агентов, подлежащих исследованию по расширенной схеме, при необходимости может быть изменен или дополнен.

На первом этапе специфической индикации происходит последовательное выявление или исключение маркеров:

- Вирусов I группы патогенности;
- Бактерий I-II групп патогенности, исключая, в первую очередь, спорообразующие бактерии;
- Вирусов II-IV и бактерий III-IV групп патогенности;
- Микромицетов II группы патогенности.

На втором этапе – выделение и идентификация культур возбудителей неустановленного систематического положения.

Специфическая индикация проводится в соответствии с единой схемой, предусматривающей следующий порядок исследования:

- прием, сортировка и регистрация проб;
- первичная обработка проб, подготовка их к исследованию, деление на аликвоты;
- концентрирование (при необходимости) ПБА с помощью физических или иммуносорбционных способов;
- исследование нативных материалов проб с помощью МФА, ПЦР, ИФА, РНГА или ИХА – при наличии тест-систем;
- постановка биопробы на ботулинический и другие токсины (заражение биопробных животных, культур клеток проводят только после получения отрицательных результатов индикации вирусов I группы патогенности);
- исследование биологически обогащенных проб с помощью тех же методов (должно быть использовано не менее 2 методов).

Время, затраченное на различные этапы исследования, зависит от количества исследуемых проб, типа материала, количества определяемых ПБА.

## ИНДИКАЦИЯ ПБА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИММУНОСЕРОЛОГИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО- ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ. ИНДИКАЦИЯ ПБА МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ АНТИТЕЛ (МФА)

Метод флуоресцирующих антител сочетает в себе иммунологическое и морфологическое исследование с люминесцентной микроскопией. МФА отличается высокой специфичностью и чувствительностью.

стью ( $1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$  м.к./мл исследуемого материала).

В настоящее время применяют прямой и непрямой варианты МФА. Для специфической индикации ПБА в исследуемых пробах в качестве основного следует применять прямой метод флуоресцирующих антител с контрастированием неспецифического свечения альбумином, меченым родамином. Непрямые модификации используют либо для выявления и титрования антител в сыворотках крови людей и животных, либо для идентификации чистых культур возбудителей.

**Для проведения специфической индикации ПБА с помощью прямого МФА необходимы:**

- наборы иммуноглобулинов сухих флуоресцирующих, меченых ФИТЦ (флуоресцеин изотиоцианат), с длиной волны возбуждения 492 нм, эмиссии – 520 нм;
- сухой сывороточный альбумин, меченый производными родамина;
- химически чистый ацетон, этиловый спирт (ФС 42-5072-00), перекись водорода для фиксации мазков;
- 0,01 М фосфатный буферный раствор (рН 7,2-7,4) с 0,87 % хлорида натрия (забуференный физиологический раствор) для отмывания препаратов в процессе их обработки люминесцирующими иммуноглобулинами;
- вода, дистиллированная (ГОСТ 6709-72) для растворения сухих люминесцирующих конъюгатов и отмывания окрашенных мазков;
- 0,15 М (изотонический) раствор хлорида натрия для приготовления рабочих разведений люминесцирующих конъюгатов;
- масло нефлуоресцирующее иммерсионное для люминесцентной микроскопии (ГОСТ 13739-78) с показателем преломления  $n_{D_0} = 1,514 - 1,516$  (или диметилфталат) и триглицериновая смесь для люминесцентной микроскопии;
- предметные и покровные стекла для приготовления мазков и препаратов для микроскопии;
- отраслевой стандартный образец мутности (ОСО 42-28-1-59-85-П ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России);
- кюветы для фиксации и окрашивания мазков, пробирки, пипетки и прочая посуда для подготовки рабочих разведений люминесцирующих конъюгатов и обработки ими мазков;
- спиртовка или горелка;
- петли бактериологические металлические или одноразовые;

- пинцет анатомический;
- микроскоп люминесцентный с объективом МИ 90х-100х, окулярами 7х-10х, фильтрами, обеспечивающими возбуждающий свет с длиной волны не более 490 нм и эмиссию с длиной волны 520 нм, разрешающей способностью до 0,2 мкм.
- боксы микробиологической безопасности II и III класса;
- холодильник с температурой 2-8 °С;
- термостат с постоянной температурой (37±0,5) °С.

**Исходным (нативным) материалом для приготовления мазков на первом этапе специфической индикации ПБА могут служить:**

- плотные и вязкие материалы пробы;
- пробы, доставленные в лабораторию в виде жидкости (смывы, взвеси и т.п.);
- жидкая фаза пробы, приготовленная из плотных и сухих материалов путем суспендирования последних в небольшом объеме изотонического раствора хлорида натрия (первичный объем жидкой фазы пробы);
- клещи и другие насекомые;
- органы животных, доставленных в лабораторию;
- секционный материал.

Доставленный на исследование материал в биксе, контейнере или сумке-холодильнике принимают в лабораторию, помещают в бокс микробиологической безопасности III класса, где открывают контейнер и выставляют емкости с зараженным материалом на поддон, покрытый многослойной марлевой салфеткой, увлажненной дезинфицирующим раствором. Нанесение материала на стекла и фиксацию мазков проводят в боксе микробиологической безопасности III класса или II класса в защитной одежде, соответствующей группе патогенности возбудителя. Аликвоты материала, предназначенные для резервного хранения, помещают в холодильник (в пластиковых емкостях с завинчивающимися крышками, герметично закрывающихся пластиковых пробирках или микропробирках). Все емкости предварительно обрабатывают снаружи дезинфицирующим раствором. Для приготовления мазков-микропрепаратов на стекле в бокс БМБ дополнительно помещают кюветы с предметными стеклами, кюветы для фиксации мазков, емкость для сброса отработанных наконечников, дозаторы переменного объема, наконечники для дозаторов. Препараты для МФА готовят путем нанесения на предметные стекла иссле-

дуемого материала.

Из плотных материалов пробы мазки готовят в виде препаратов-отпечатков на предметном стекле.

Из жидких материалов, как и из жидкой фазы пробы (взвеси, смывы, вода и т. п.), мазки готовят в виде маленьких капель, наносимых на стекло в центре каждого квадрата бактериологической петлей диаметром 2-3 мм. Растирать каплю на стекле не следует, так как именно у края капли в большем количестве располагаются содержащиеся во взвеси микроорганизмы, что облегчает их выявление при микроскопии. Использование бактериологической петли для приготовления мазков обеспечивает получение тонкой капли и исключает необходимость расходования стерильных пипеток.

При наличии во взвеси грубых посторонних частиц ее следует предварительно профильтровать через 2-3 слоя марли.

Из секционного материала, органов и тканей животных мазки готовят в виде отпечатков на предметном стекле. Для этого от исследуемого органа отрезают кусочек и поверхностью среза слегка прикасаются к предметному стеклу. Если ткань органа чрезмерно пропитана кровью, избыток последней целесообразно предварительно удалить, прикоснувшись срезом сначала к листу фильтровальной бумаги.

На втором и третьем этапе специфической индикации мазки для люминесцентной микроскопии готовят из выросших колоний, а также из органов, зараженных биопробных животных (брюшина, селезенка). При выявлении подозрительных колоний на плотных питательных средах из них делают взвесь в небольшом количестве 0,9 % раствора натрия хлорида до появления легкой опалесценции.

Если рост на питательных средах в виде сплошного налета, взвесь делают из всей поверхности чашки двумя крестообразными штрихами в небольшом количестве 0,9 % раствора натрия хлорида. Затем эту взвесь разбавляют до концентрации, соответствующей 10 ед. отраслевого стандартного образца мутности (ОСО 42-28-59-85-П ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России), и из этой взвеси готовят мазки.

Мазки делают на чистых, обезжиренных предметных стеклах, разграфленных на 8-10 частей. На одном разграфленном стекле готовят мазки из 8-10 проб, которые затем обрабатывают одной люминесцирующей сывороткой. Номера проб и название сыворотки указывают на краевой шлифованной поверхности стекла. Количество стекол с мазками соответствует числу использованных сывороток. Одно

стекло должно быть резервным на случай повторного исследования. После фиксации мазка его хранят на холоде до конца анализа без обработки люминесцирующими иммуноглобулинами.

Все приготовленные мазки высушивают на воздухе при комнатной температуре. Обдувание мазков вентилятором для ускорения процесса высыхания не рекомендуется, так как это может привести к образованию в помещении вторичного аэрозоля. Не целесообразно применять для этой цели и подогревание мазков (выше 40 °С), поскольку на поверхности быстро высыхающей капли в некоторых случаях может образоваться пленка, затрудняющая в дальнейшем исследование мазков с помощью МФА.

Подсушенные мазки для МФА фиксируют погружением в фиксатор с 96 ° этиловым спиртом или химически чистым ацетоном на 30 мин, не допуская слипания между собой отдельных предметных стекол. Мазки из проб с подозрением на зараженность спорообразующими микроорганизмами фиксируют в смеси этилового 96 ° спирта с 3 % перекисью водорода в течение 30 мин.

**Приготовление фиксатора:** во флакон с 180 мл 96 ° этилового спирта добавляют 20 мл 30 % раствора перекиси водорода. Срок хранения фиксатора 1 месяц при наличии плотной, герметично закрывающейся крышки. После окончания времени экспозиции стекла с мазками рекомендуется промыть под струей воды в течение 3-5 мин с целью исключения негативного воздействия перекиси водорода на специфическую флуоресценцию.

После экспозиции стекла с мазками достают пинцетом из фиксатора и подсушивают в штативе для стекол на воздухе. Стекло с фиксированным мазком может храниться при температуре 4 °С в течение 7 сут.

В соответствии с инструкцией производителя готовят рабочие разведения флуоресцирующих иммуноглобулинов в 0,9 % растворе натрия хлорида. Препарат в рабочем разведении используют в день приготовления. Специфические флуоресцирующие иммуноглобулины размещают в штативе в строгой последовательности, соответствующей схеме нанесения препаратов на стекла.

В целях повышения достоверности результатов люминесцентного анализа целесообразно использование методических приемов для устранения или снижения интенсивности фоновой флуоресценции препаратов. Это достигается путем одновременной окраски мазков

флуоресцирующими конъюгатами в сочетании с контрастирующим сывороточным альбумином, обеспечивающим отличное по цвету свечение фона. С этой целью используют смесь, состоящую из равных объемов специфических флуоресцирующих АГ, меченных флуоресцеин-5-изотиоцианатом (излучающим зеленый цвет), и контрастирующего альбумина нормальной сыворотки (лошадиной, бычьей, кроличьей), конъюгированного с родаминовым красителем (обладающим оранжевой люминесценцией). При окраске препаратов такой смесью специфический флуоресцирующий Ig сообщает зеленое свечение только гомологичному АГ, тогда как остальные компоненты препарата (тканевые элементы, гетерологичные микроорганизмы и их АГ, прочие примеси) приобретают способность светиться оранжево-красным цветом благодаря неспецифической физико-химической сорбции меченого альбумина.

Важнейшим условием правильного составления рабочей смеси конъюгата является оптимальный подбор в ней соотношения флуоресцирующего Ig, меченого ФИТЦ, и альбумина, меченого родамином. Эти соотношения для каждой новой партии флуоресцирующих конъюгатов подбирают опытным путем, поскольку указанные на этикетке ампулы рабочие разведения являются ориентировочными. Титрование флуоресцирующего конъюгата целесообразно проводить на контрольных мазках, содержащих гомологичные флуоресцирующим иммуноглобулинам микроорганизмы или их АГ. При окраске мазков с контрастированием неспецифического свечения на них наносят смесь флуоресцирующих иммуноглобулинов с альбумином, меченым родамином, в соотношении 1:1, разведенных до половины рабочего титра.

До начала работы коммерческие люминесцирующие иммуноглобулины и контрастирующий альбумин растворяют дистиллированной водой в объеме, указанном на этикетке ампулы. К использованию пригодны лишь те конъюгаты, которые легко и без осадка растворяются в течение 1-3 мин. Растворенные конъюгаты могут храниться при температуре 2-4 °С в течение 14 сут, будучи плотно закрытыми.

Рабочие разведения сывороток можно хранить при температуре 2-4 °С не более семи суток, а срок хранения рабочих смесей конъюгатов не должен превышать 24 ч.

***Подготовка люминесцирующей сыворотки и определение ее рабочего разведения.*** Сухую люминесцирующую сыворотку рас-

творяют в указанном на этикетке ампулы объеме дистиллированной воды. Непосредственно перед окраской препаратов люминесцирующую сыворотку разводят забуференным физиологическим раствором (ЗФР) до рабочего разведения, которое предварительно перепроверяют. Для этого микроскопируют мазки из эталонных культур микроорганизмов (диагностикумов), окрашенных люм. сывороткой, взятой в разных разведениях (обязательно на 1-2 разведения выше и ниже рабочего титра, указанного на этикетке). Максимальное разведение сыворотки, которое обеспечивает яркое (на 4+ и 3+) флуоресцентное окрашивание микробных клеток, является красящим титром. В качестве рабочего разведения сыворотки, используемого для окрашивания исследуемых препаратов, применяют вдвое концентрированный красящий титр. Например, если красящий титр сыворотки оказался 1:32, то ее рабочее разведение будет 1:16.

**Определение рабочего разведения контрастирующего альбумина.** Из цельного раствора альбумина, меченого родамином, готовят ряд двукратных разведений в стерильном ЗФР (рН 7,2) от 1:2 до 1:128, наносят на контрольные «грязные» мазки (с посторонней микрофлорой) и инкубируют во влажной камере при 37 °С в течение 30 мин. Затем мазки промывают дважды по 5-10 мин ЗФР, ополаскивают дистиллированной водой, подсушивают на воздухе и микроскопируют. В полевых условиях вместо ЗФР мазки можно промывать проточной водой, а затем ополаскивать дистиллированной. Последнее разведение контрастирующего альбумина, дающее оранжево-красное свечение микробных клеток в мазке на 1-2 креста, принимают за красящий титр. Соответственно, рабочее разведение меченого альбумина будет в 2 раза ниже красящего титра.

**Определение рабочего разведения специфических флуоресцирующих иммуноглобулинов в смеси с контрастирующим альбумином, меченым родамином.** Двукратные разведения испытуемого специфического флуоресцирующего Ig смешивают с удвоенным рабочим разведением контрастирующего альбумина и окрашивают контрольные мазки, приготовленные из взвеси гомологичных микроорганизмов, как сказано выше. Последнее разведение, обеспечивающее яркое изумрудно-зеленое специфическое свечение микробов на 3+ и 4+ на оранжево-красном фоне препарата, является красящим титром испытуемого специфического Ig. Для дальнейшей работы смешивают в равных объемах удвоенные рабочие разведения альбумина и

специфического флуоресцирующего Ig.

**Окрашивание мазков.** На фиксированные и высушенные мазки наносят рабочую смесь специфического люминесцирующего иммуноглобулина и контрастирующего альбумина и равномерно распределяют по поверхности окрашиваемого препарата так, чтобы вся площадь мазка была покрыта конъюгатом.

Обработку мазков (препаратов) конъюгатами проводят во влажной камере при температуре 37 °С в течение 20 мин.

Окрашенные и отмытые мазки высушивают на воздухе при комнатной температуре.

Отмывка окрашенных препаратов производится в течение 7-10 мин в двух-трех порциях 0,9 % раствора хлорида натрия (рН 7,0-7,6), а затем ополаскиванием дистиллированной водой. После подсушивания препаратов на воздухе их просматривают под люминесцентным микроскопом.

При просмотре препаратов, окрашенных противобактериальными, противогрибковыми и противориккетсиозными сыворотками необходимо пользоваться сразу иммерсионными объективами. При применении иммерсионных объективов используется специальное нефлуоресцирующее масло, а при отсутствии последнего – химически чистый или перегнанный диметилфталат. Иммерсионное масло (диметилфталат) наносится непосредственно на исследуемый объект. Однако более интенсивное свечение гомологичных (к люминесцирующей сыворотке) микроорганизмов наблюдается, когда перед просмотром препарата на него наносят каплю смеси, состоящей из 9 частей глицерина и одной части забуференного раствора хлористого натрия (рН 7,2-7,4), накрывают покровным стеклом, на которое наносят каплю нефлуоресцирующего масла или диметилфталата. Особое внимание при просмотре мазков (из взвесей) следует обращать на его край, где чаще всего концентрируются возбудители.

Для получения достоверных результатов исследования (особенно при низких концентрациях возбудителя в пробе) под люминесцентным микроскопом просматривают не менее 20-25 полей зрения.

Учет результатов производят согласно инструкции производителя флуоресцирующих иммуноглобулинов по четырех крестовой системе на основании выявления морфологических особенностей микроорганизмов и локализации возбудителя, а также оценки интенсивности и специфичности (структуры) его свечения:

«++++» – яркая сверкающая флуоресценция изумрудно-зеленого цвета, четко выявляются морфологические особенности микроорганизма, вокруг корпускулярных агентов может наблюдаться ярко светящийся ободок;

«+++» – яркая флуоресценция зеленого цвета, морфологические особенности микроорганизма выявляются достаточно отчетливо, нередко хорошо видны периферические ободки;

«++» – слабая флуоресценция желтовато-зеленого цвета, морфологические особенности микроорганизмов выявляются еще достаточно четко, периферические ободки почти не видны;

«+» – очень слабая флуоресценция неопределенного цвета, микроорганизмы различают с трудом;

«-» – флуоресценция объекта отсутствует.

Обычно за положительные результаты принимается флуоресценция клеток не ниже, чем на «+++», при наличии в большинстве полей зрения единичных специфически светящихся (изумрудным или зеленым цветом) микробов.

Результаты считаются положительными, если в препарате обнаруживаются хотя бы единичные (для мелких бактерий и риккетсий – не менее 10 особей) морфологически типичные микроорганизмы, специфически флуоресцирующие на 3-4 креста, при отрицательных контролях.

Контролем на специфичность используемых люминесцирующих сывороток являются все остальные мазки данной пробы, которые обрабатываются флуоресцирующими антителами, гетерологичными к содержащимся в пробе возбудителям. Кроме того, в качестве контроля используются препараты, приготовленные из заведомо не содержащих возбудителя материалов (например, отпечатки органов здоровых животных и др.) и обработанных соответствующими люминесцирующими сыворотками с альбумином, меченым родамином.

Предварительный ответ по результатам МФА выдается через 1-2 ч после получения пробы только в случае обнаружения возбудителя в исследуемой пробе.

Результаты просмотра препаратов вносят в рабочий журнал лаборатории и единый журнал регистрации и кодирования, оформляют протокол исследований, фиксируют протокол в журнале регистрации протоколов.

## РЕАКЦИЯ НЕПРЯМОЙ (ПАССИВНОЙ) ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ (РНГА)

РНГА основана на феномене склеивания нагруженных антителами эритроцитов под влиянием гомологичных антигенов. Для постановки реакции используются формализированные или акролеинизированные эритроциты, сенсibilизированные антителами соответствующих иммунных сывороток. РНГА применяют для серологической диагностики инфекционных заболеваний, ускоренного обнаружения патогенных микроорганизмов в объектах внешней среды и различном биологическом материале. Постановку осуществляют с использованием коммерческих эритроцитарных иммуноглобулиновых диагностикумов. Чувствительность РНГА –  $1 \times 10^5$ – $1 \times 10^6$  м.к./мл пробы ( $\geq 50$  мкг токсинов).

РНГА ставят микрометодом в полистироловых пластинах с небеззараженным материалом, поэтому при выполнении этих исследований должны строго соблюдаться определенные правила биологической безопасности, регламентированные в СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

**Оснащение:** наборы антительных эритроцитарных диагностикумов; 50 % взвесь формализированных эритроцитов барана, иммунные сыворотки; нормальная лошадиная (НЛС) или кроличья сыворотка (НКС); 0,9 % раствор хлорида натрия; бактериологические пробирки; пипетки градуированные; полистироловые пластины с луночками для микрометода; автоматические микродозаторы с переменным объемом и сменные наконечники для них, водяная баня для инактивации сывороток.

**Постановка реакции:** исследуемую пробу разливают в лунки полистироловой пластины в объеме 25 мкл (две лунки на один диагностикум). Первая лунка является опытной (собственно РНГА), вторая – контрольной (РТНГА). В первую лунку добавляют 25 мкл нормальной кроличьей или лошадиной сыворотки, во вторую – равный объем соответствующей искомому антигену иммунной сыворотки в разведении 1:10, которую предварительно инактивируют при температуре 56 °С в течение 30 мин. После контакта при комнатной температуре в течение 15-20 мин в обе лунки вносят по 25 мкл хорошо перемешанной 1 % взвеси эритроцитов, сенсibilизированных антителами к определенному антигену. Планшеты встряхивают и оставляют при

комнатной температуре на 1,5-2 ч, после чего учитывают результаты. Реакция считается положительной, если в опытной лунке эритроциты равномерно устилают все ее дно («зонтик»). При отрицательном результате осадок эритроцитов выглядит как маленькая пуговка. В контрольной лунке, где ставилась РТНГА со специфической иммунной сывороткой, должен быть четкий отрицательный результат. Если же феномен агглютинации наблюдается в обеих лунках, реакцию необходимо повторить. Иногда положительная реакция в контроле может быть обусловлена избытком антигена в исследуемом материале. Для выяснения этого материал разводят в 10-20 раз 0,9 % раствором хлорида натрия и повторяют реакцию. В случае получения повторных положительных результатов в опытной и контрольной лунках реакция считается неспецифической.

Специфичность РНГА во многом зависит от характера исследуемого материала. Неспецифические результаты могут наблюдаться при большом содержании в исследуемом материале различных частиц органического и неорганического происхождения, а также при значительной концентрации белков.

***Принцип РТНГА.*** Взаимодействие гомологичных АГ и АТ приводит к их нейтрализации, в результате чего тормозится агглютинация эритроцитов, сенсibilизированных специфическими АТ. Если АГ и АТ гетерологичны, то их взаимодействие не произойдет и свободные АГ не вызовут агглютинацию индикаторных эритроцитов. РТНГА используется в качестве контроля специфичности РНГА, эти реакции ставятся параллельно!!! Компоненты и материалы те же, что в РНГА. Дополнительно – специфическая иммунная сыворотка, разведенная 1:10.

При исследовании загрязненного материала в пробирки добавляют 50 % взвесь формализированных эритроцитов барана из расчета 1 капля взвеси на 1 мл пробы с целью устранения возможных неспецифических результатов реакции. Смесь тщательно встряхивают, выдерживают 15 мин в термостате при 37 °С. Затем центрифугируют при 1000-2000 об/мин в течение 3-5 мин. Надосадочную жидкость отсасывают для постановки РНГА и РТНГА. Пробы воды, другие относительно малозагрязненные образцы, смывы чистой культуры с чашек можно не адсорбировать 50 % взвесью эритроцитов.

***Учет и оценка результатов РНГА:*** Через 2 ч с момента постановки реакции проводят предварительный учет результатов, окончательный – через 2-6 ч. Характер осадков эритроцитов оценивают по

4-крестовой шкале:

«+++» – агглютинировавшие эритроциты ровным слоем выстилают все дно лунки, образуя по форме перевернутый купол (зонтик);

«++» – по окружности равномерно агглютинировавших эритроцитов отмечается тонкое («фестончатое») кольцо;

«+» – на фоне равномерно агглютинировавших эритроцитов отмечается кольцо меньшего диаметра с более ровным краем;

«-» – четкое кольцо малого диаметра на слабо различимом фоне агглютинировавших эритроцитов;

«>» – агглютинация эритроцитов отсутствует, на дне лунки образуется маленькое кольцо с четким ровным краем или компактный диск (пуговка).

**Учет и оценка результатов РТНГА:** аналогичен учету результатов РНГА (положительный результат – зонтик, отрицательный – диск (пуговка)).

Протокол по результатам этих реакций может быть выдан через 2-6 ч от начала исследования.

## ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ (ИФА)

Иммуноферментный анализ (ИФА) в настоящее время является одним из наиболее широко используемых в микробиологии методом изучения различных антигенов и антител. Преимуществами метода являются экспрессность, специфичность, наглядность, воспроизводимость, доступность и стабильность реагентов, возможность автоматизации для массовых исследований. Чувствительность ИФА на 1-2 порядка превышает возможности известных серологических методов и составляет  $5 \times 10^4 - 1 \times 10^5$  м.к./мл.

Принцип иммуноферментного анализа заключается в связывании фермента с иммунологически активными компонентами, в результате чего образуется комплекс «антитело-фермент», который, с одной стороны, обладает иммунологической специфичностью, с другой – сохраняет энзимную активность. Высокая чувствительность ИФА связана с каталитическими свойствами ферментов, одна молекула которых может реагировать с большим количеством (несколько тысяч) молекул субстрата. Реакция антитела с антигеном происходит на поверхности твердой фазы, поэтому метод получил название «энзимсвязанный иммуносорбентный анализ» (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA). Применение в ИФА моноклональных

антител, обладающих строго определенной специфичностью и одинаковой аффинностью, позволяет повысить качество исследований (специфичность).

В настоящее время выпускается достаточное количество тест-систем и диагностических препаратов для выявления в ИФА антигенов возбудителей многих инфекционных, вирусных и паразитарных заболеваний человека и животных, с помощью которых в течение 2-6 ч может быть проведено исследование.

Для индикации и идентификации возбудителей применяют прямую и непрямую модификации ИФА с использованием иммуноглобулиновых иммуносорбентов (антитела, фиксированные на твердой фазе).

При прямой модификации (сэндвич-вариант) сенсibilизированные на твердую фазу антитела взаимодействуют с антигеном исследуемого материала и далее – с антителами к искомому антигену, мечеными ферментом:  $At+Ag+At=\Phi + \text{энзимный субстрат}$ .

При непрямой модификации используют меченый ферментом антивидовой иммуноглобулин:  $At + \text{материал с предполагаемым } Ag+At$  к  $Ag+At$  против антисыворотки, меченые ферментом + энзимный субстрат.

#### ***Оснащение:***

- диагностические наборы для проведения ИФА;
- спектрофотометр с диапазоном длины волны, необходимым для измерения оптической плотности растворов;
- термостат с регулируемой (настраиваемой) температурой от 25 до 37 °С;
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру 2-8 °С;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками объемом от 5 до 1000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками объемом от 5 мкл до 350 мкл и наконечники с ней;
- промыватель планшет;
- бумага фильтровальная;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная
- физиологический раствор (0,15 М раствор NaCl)

***Постановка ИФА.*** ИФА ставится всего в двух лунках полистироловых панелей или (при использовании варианта dot-blot) на нитро-

целлюлозных мембранах – в двух квадратах), согласно инструкции производителя. При получении сомнительных результатов реакция должна быть поставлена повторно с раститровкой материала в 5-6 лунках или каплях. Особенности постановки ИФА при использовании тест-системы для конкретного возбудителя отражены в инструкции по применению к ней.

Оценку результатов проводят визуально и при помощи регистрирующих приборов (фотометра, ИФА-ридера) по интенсивности реакции (окрашивания) в разведениях исследуемой пробы. Измеряемым параметром служит оптическая плотность (ОП) продукта реакции энзим-субстрат. Реакция считается положительной, если ОП опыта превышает ОП контрольной лунки в 2-3 раза (величина определяется производителем поставляемых тест-систем).

### ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ (ИХА)

Иммунохроматографический анализ, появившийся в конце 1980-х годов (Zuk R.F. et al., 1978), основанный на принципе вертикально направленной иммунохроматографии, хорошо зарекомендовал себя как экспресс-метод выявления возбудителей инфекционных заболеваний и токсинов. ИХА основан на специфическом взаимодействии меченых коллоидным золотом антител и целевых антигенов с образованием визуально регистрируемого иммунопреципитата. Для его проведения используют фильтрационные полоски, заключенные в пластиковую панель с круглым окошком для добавления исследуемого образца и прямоугольным окошком для считывания результатов (промаркированного буквами «Т» – аналитическая зона и «С» – контрольная зона). Нанесенная на мембрану проба вначале реагирует с коллоидным конъюгатом, а затем последовательно с фронтом жидкости преодолевает аналитическую и контрольную зоны, где происходит формирование окрашенных полос. Чувствительность зарегистрированных в настоящее время ИХ-тест-систем составляет для токсинов – от 20 нг/мл до 1 мкг/мл, в зависимости от вида,  $10^6$ - $10^7$  м.к./мл – для возбудителей опасных инфекционных болезней.

Преимущества ИХА: время анализа 10-20 мин., визуальная регистрация, отсутствие необходимости дополнительного оборудования для выполнения тестирования и регистрации результата, не требуется специальной подготовки персонала, возможность использования у постели больного или в полевых условиях, не требует проведения

процедур отмывки и других манипуляций, в отличие от традиционного ИФА.

ИХА предназначен для экспресс-выявления и идентификации патогенных биологических агентов (микроорганизмов, биологических токсинов) в культуральных взвешях, суспензиях внутренних органов животных и объектах окружающей среды.

Иммунохроматографические индикаторные элементы выпускаются в виде хаузенг-стрипов (индивидуальная пластиковая упаковка для каждого анализа) или готовых к использованию мембранных ИХ - полосок, упакованных по 10-20 штук в пластиковую пробирку.

***Для проведения иммунохроматографического анализа необходимы:***

- иммунохроматографический индикаторный элемент,
- 0,01 М натрий-фосфатный буфер, рН 7,4 (ФБР) или буфер в составе набора;
- автоматический дозатор переменного объема или одноразовые пипетки объемом 1,0 мл;
- наконечники с фильтром для защиты образца и дозатора от контаминации;
- пробирки бактериологические стеклянные или пластиковые одноразовые;
- чашки Петри пластиковые одноразовые;
- пластиковые одноразовые микропробирки объемом 1,5 мл;
- микробиологическая петля;
- спиртовая или инфракрасная горелка;
- ножницы.

Исходным (нативным) материалом для специфической индикации ПБА могут служить:

- смывы с твердой поверхности объектов окружающей среды;
- жидкие образцы;
- биологические аэрозоли, переведенные в жидкую фазу;
- суспензии микроорганизмов;
- суспензии внутренних органов животных (печень, селезенка белых мышей и морских свинок).

***Подготовка проб к анализу. Смыв с твердой поверхности:*** наибольшим ватным тампоном, смоченным в буфере, тщательно протирают твердую поверхность, подозрительную на наличие ПБА. Переносят ватный тампон в пробирку с 1 мл буфера и круговыми

движениями перемешивают содержимое пробирки в течение 10-15 с, прижимая тампон к стенке пробирки. Удаляют тампон из пробирки, отжимая жидкость о боковые стенки пробирки. Отбирают пипеткой или дозатором из пробирки пробу и вносят ее в отверстие для нанесения образца.

**Подготовка жидкого образца:** пластиковой пипеткой набирают исследуемый жидкий образец и вносят в пробирку. Затем в пробирку вносят приблизительно равное количество буфера. Круговыми движениями перемешивают содержимое пробирки.

Исследуемые образцы не должны содержать суспензий жировых капель, органических растворителей, кислот, сильных восстановителей или окислителей, ионных детергентов. Большое количество мелкодисперсной пыли, присутствующей в образце, также может препятствовать анализу. От механических примесей образец может быть очищен фильтрацией или центрифугированием. Значение pH образца с внесенным в него буфером должно быть не менее 7,0. Уровень pH можно довести до необходимого внесением в образец 1 Н NaOH.

**Проведение анализа.** При анализе неизвестных образцов необходимо соблюдать меры предосторожности и обращаться с ними, как с потенциально инфицированными, в соответствии с действующими санитарно-эпидемиологическими правилами по безопасности работы с микроорганизмами I-II групп патогенности. Медицинские отходы, образующиеся при проведении анализа и относящиеся к классу В, следует дезинфицировать в емкости с 6 % раствором перекиси водорода с добавлением 0,5 % синтетического моющего средства (СМС) в течение 2 ч, затем автоклавировать при температуре 132 °С и давлении 2 атм. в течение 1,5 ч.

Для проведения анализа извлекают необходимое количество иммунохроматографических элементов из холодильника и выдерживают 15 мин при комнатной температуре.

Непосредственно перед анализом вскрывают фольгированный упаковочный пакет, извлекают ИХТ, промаркировывают, помещают их в чашку Петри, находящуюся на хорошо освещенной горизонтальной поверхности. С помощью пипетки или дозатора в окошко для добавления образца вносят 100 мкл жидкой пробы. Анализ с применением ИХ-тест-систем должен проводиться при комнатной температуре.

**Учет результатов анализа** осуществляют визуально в течение 15-20 мин после внесения исследуемого образца. Результаты, полу-

ченные позднее этого срока, – недостоверны. В случае присутствия в пробе ПБА (положительный результат анализа) в окошке для считывания результатов должны наблюдаться две линии красного цвета, расположенные в аналитической и контрольной зонах. Интенсивность полос учитывать не следует. Появление даже слабо окрашенной линии в аналитической зоне свидетельствует о положительном результате анализа. Интерпретацию результатов проводят в соответствии с таблицей 1.

**Таблица 1**

**Интерпретация результатов иммунохроматографического анализа**

Окраска полос	Результат
Наличие видимых глазом красных линий в зонах «С» и «Т»	Положительный результат (наличие в пробе ПБА)
Наличие красной линии только в зоне «С»	Отрицательный результат (отсутствие в пробе ПБА, либо его наличие в концентрации ниже чувствительности ИХ-тест-системы)
Наличие красной линии в зоне «Т» при отсутствии линии в зоне «С»	Не корректный результат
Отсутствие красных линий в зонах «С» и «Т»	Не корректный результат

ИХ-тест-системы необходимо хранить в герметично закрытой упаковке в сухом защищенном от света месте при температуре 2-8 °С. После вскрытия упаковки тест-систему можно использовать в течение 1 сут.

**ИНДИКАЦИЯ ПБА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЦР**

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – метод амплификации (умножения) участка генома путем многократного копирования специфичной для данного организма нуклеотидной последовательности. Способ обнаружения патогенов с помощью ПЦР позволяет выявлять как типичные, так и видоизмененные формы бактерий (L-варианты), в том числе, минуя этап предварительного культивирования исследуемого материала, проводить индикацию труднокультивируемых микроорганизмов. Из современных методов лабораторной диагностики

ПЦР обладает самой высокой на сегодняшний день чувствительностью ( $1 \times 10^3$ - $1 \times 10^4$  м.к./мл или ГЭ/мл) и может быть выполнена в течение 6-12 ч.

Реакция основана на способности фермента ДНК-полимеразы синтезировать новую цепь ДНК на одноцепочечной матрице, начиная с олигонуклеотидных праймеров. Праймеры комплементарны противоположным цепям ДНК в участках, ограничивающих выбранную область ДНК, и ориентированы 3'-концами навстречу друг другу.

Если в анализируемом образце присутствует искомая ДНК, то в процессе реакции амплификации с ней происходят изменения, которые обеспечиваются определенными температурными циклами (обычно ПЦР включает 30-50 циклов), каждый из которых состоит из трех этапов:

1. Денатурация – переход ДНК из двухцепочечного состояния в одноцепочечное при разрыве водородных связей между комплементарными парами оснований противоположных цепей ДНК под воздействием высоких температур (94-96 °С).

2. Отжиг праймеров – присоединение праймеров к одноцепочечной ДНК-мишени. Температура отжига (40-60 °С) зависит от нуклеотидного состава праймеров и обычно выбирается на 4–5 °С ниже их температуры плавления.

3. Элонгация (синтез). После отжига праймеров Таq-полимераза при 72 °С начинает достраивание второй цепи ДНК с 3'-конца праймера с использованием дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (дНТФ), входящих в состав реакционной смеси.

При индикации вирусов, геном которых представлен РНК (ВИЧ, гепатит С, вирусы гриппа и другие) перед постановкой ПЦР требуется проведение реакции обратной транскрипции (ОТ). Суть реакции – синтез двухцепочечной ДНК на матрице одноцепочечной РНК. Для этого одноцепочечную молекулу РНК при помощи фермента ревертазы и смеси случайных декануклеотидных праймеров превращают в комплементарную ДНК (кДНК) и далее амплифицируют уже ДНК-матрицу, используя традиционную ПЦР.

В связи с высокой чувствительностью ПЦР может возникать серьезная техническая проблема – контаминация положительно реагирующей ДНК. Попадание в реакционную пробирку следовых количеств продуктов амплификации, положительного контроля, нуклеиновых кислот из исследуемых проб приводит к амплификации

специфичного фрагмента и, как следствие, появлению ложноположительных результатов. Во избежание этого должны быть выполнены определенные требования к проведению ПЦР-исследования, что регламентируется в МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

**Подготовка материала для анализа методом ПЦР.** Забор материала, его предварительная обработка, хранение и перевозка, передача исследуемого материала в другие организации осуществляется согласно инструктивно-методическим документам, регламентирующим выполнение исследований для каждого вида возбудителя инфекций, инструкциям к наборам реагентов и в соответствии с СанПиН 3.3686-21, МУ 1.3.2569-09 (Приложение 1).

С целью предотвращения повреждения ДНК-мишеней возможно использование транспортной среды различного состава, в зависимости от вида исследуемого материала.

Перевозку и хранение материала рекомендуется осуществлять в условиях «холодовой цепи» с обеспечением необходимого контроля установленного температурного режима при помощи термоиндикаторов.

В зависимости от используемой транспортной среды, вида исследуемого материала и температурного режима сроки перевозки и хранения материала могут варьировать в широком диапазоне.

Обеззараживание поступившего материала для ПЦР-исследования проводят в соответствии с действующими методическими указаниями по организации работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности (Приложение 2).

**Выделение ДНК.** Выделение ДНК/РНК после обеззараживания проб осуществляют по стандартным методикам с использованием зарегистрированных наборов реагентов.

Для выделения нуклеиновых кислот в лабораторной практике используют два наиболее распространенных подхода:

1. Сорбентные методы выделения – дифференциальная сорбция нуклеиновых кислот (допустимо выделение как ДНК, так и РНК) на твердом носителе (чаще всего: силикагель с повышенным отрицательным зарядом или модифицированной поверхностью, стеклянные

бусы, диатомовая земля, стеклянное «молоко» и т.д.).

Нуклеиновая кислота обратимо связывается с сорбентом в присутствии высокой концентрации хаотропных солей (например, гуанидин тиоцианат). Ингибиторы и другие компоненты клинического материала остаются в растворе. Кроме хаотропных солей в лизирующем буфере чаще всего присутствуют детергенты, которые способствуют растворению и лизису белков. С помощью центрифугирования силика с НК осаждается, а супернатант с ингибиторами ПЦР удаляется. Серия последующих отмывок обеспечивает получение высокоочищенного препарата НК.

2. Спиртовое осаждение (преципитация) – агрегация НК (как ДНК, так и РНК) в присутствии соли и спирта. После осаждения спиртом НК отделяется от раствора центрифугированием. Осадок, содержащий целевую НК, неоднократно промывается спиртами и концентрируется центрифугированием. На завершающем этапе процедуры происходит растворение НК в водном буфере, часто в процессе нагревания до 55-65 °С для лучшего растворения осадка.

**Аmplификация ДНК.** Постановку ПЦР осуществляют в соответствии с инструкциями к диагностическим препаратам.

Учет результатов ПЦР методом электрофореза в агарозном геле. Продукты ПЦР анализируют методом горизонтального электрофореза в 1-2 % агарозном геле в камере для электрофореза с блоком питания и набором штампов для подготовки геля.

Для приготовления 1,5 % агарозного геля к 1,5 г агарозы добавляют 100 мл 1хТАЕ или 1хТВЕ буфера. Смесь помещают в термостойкую колбу и нагревают в СВЧ-печи или на водяной бане до полного растворения агарозы. После чего расплавленную смесь охлаждают до температуры 55-60 °С, далее с помощью автоматического дозатора добавляют бромистый этидий до конечной концентрации 0,5 мкг/мл, тщательно перемешивают гель и выливают на подготовленный столик для заливки. С помощью специального штампа «гребенки» на катодном конце геля формируют лунки для нанесения проб (ДНК движется от катода к аноду). Между дном лунок и основанием геля должен оставаться слой агарозы толщиной 0,5-1,0 мм.

Буферные емкости камеры для электрофореза заполняют 1хТАЕ или 1хТВЕ буфером настолько, чтобы он покрывал гель слоем 3-5 мм.

К 5 мкл амплифицированного продукта добавляют 1 мкл лидирующего красителя, перемешивают и 6 мкл вносят в лунки геля. Элек-

трофорез проводят в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора в течение 30-45 мин при градиенте напряжения 7-10 В/см. Краситель должен пройти 2/3 длины трека. По окончании электрофореза агарозный гель вынимают из камеры и просматривают под ультрафиолетовым излучением, для чего используют трансиллюминатор с максимальной длиной волны 254-312 нм. Энергия ультрафиолета, поглощаемая ДНК в области 260 нм, передается на интеркалирующий краситель, заставляя его флуоресцировать в области 590 нм. Анализируемые фрагменты проявляются в геле в виде светящихся розово-красных полос. Гель анализируют с помощью компьютерной системы для гель-документирования или фотографируют в проходящем ультрафиолете.

#### ***Оценка результатов ПЦР:***

- в отрицательном контроле полосы фрагментов ДНК должны отсутствовать;
- в положительном контроле выявляется полоса ДНК заданного размера;
- отсутствие полос в анализируемых пробах на уровне положительного контроля свидетельствует об отрицательном ответе, наличие полос, соответствующей по электрофоретической подвижности положительному контролю, свидетельствует о наличии в пробе ДНК искомого микроорганизма;
- наличие полос ампликонов, располагающихся на электрофореграмме выше или ниже контрольной полосы, является неспецифичным ответом, и результат реакции оценивается как отрицательный.

Результаты анализа не подлежат учету в следующих случаях:

- в положительном контроле отсутствует специфичная полоса (ошибка в постановке ПЦР, неправильное хранение или загрязнение реактивов в процессе работы, сбой программы амплификатора). Требуется повторная постановка реакции;
- в отрицательном контроле выявляется специфичная полоса на уровне положительного контроля (контаминация реактивов положительно реагирующей ДНК или продуктами амплификации). Необходимо поставить дополнительные отрицательные контроли на этапе постановки ПЦР и выделения ДНК. Если результат повторяется – следует сменить реактивы.

Учет результатов ПЦР при использовании гибридационно-флуоресцентного метода детекции. Анализ результатов проводят с помо-

шью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по указанным в инструкции каналам.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК (кДНК) значения порогового цикла «Сt» в соответствующей графе в таблице результатов.

Принцип интерпретации результатов следующий:

Искомая ДНК/кДНК обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для соответствующего флуорофора определено значение порогового цикла Сt, не превышающее граничное, указанное во вкладыше к набору. При этом кривая флуоресценции каждой исследуемой пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции;

- искомая ДНК/кДНК не обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК ВКО (внутреннего контрольного образца), в значении порогового цикла Сt, не превышающее указанное (граничное) значение, а по каналу для флуорофора, свидетельствующего о накоплении продукта амплификации ДНК искомого возбудителя, не определено значение порогового цикла Сt.

- результат анализа невалидный, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла Сt по искомым каналам или превышает указанное граничное значение. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего образца, начиная с этапа экстракции.

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и положительного и отрицательного контролей экстракции ДНК/РНК (в соответствии с инструкцией к используемому набору реагентов). Протокол по результатам реакции может быть выдан через 6-12 ч от момента поступления материала в лабораторию.

## СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ИНДИКАЦИЯ БОТУЛИНИЧЕСКИХ ТОКСИНОВ (БТ)

Индикацию БТ в исследуемом материале проводят согласно единой схеме анализа методами постановки РНГА и биологической пробы на белых мышах. Исследованию подвергают только нативный материал пробы.

**Реакция непрямой гемагглютинации.** Перед постановкой РНГА исследуемый на ботулотоксин материал прогревают при 56 °С 20 мин, адсорбируют 50 % взвесью формализированных эритроцитов барана в течение 15 мин и центрифугируют 5 мин при 3000 об/мин. РНГА с надосадочной жидкостью ставят в 96-луночном полистироловом микропланшете с четырьмя или пятью типами ботулинических иммуноглобулиновых антитоксических эритроцитарных диагностикумов. В несколько лунок микропланшета автоматическим дозатором вносят по 25 мкл исследуемого материала и 25 мкл ботулинического иммуноглобулинового антитоксического эритроцитарного диагностикума (из имеющихся в наличии моновалентных сывороток 4-5 видов). Обязательна постановка контролей: одна лунка – контроль АГ, сюда вносят 25 мкл заведомо положительного образца + соответствующий иммуноглобулиновый ботулинический эритроцитарный диагностикум, вторая лунка – контроль диагностикума (ЗФР, содержащий 1 % НКС + соответствующий иммуноглобулиновый ботулинический эритроцитарный диагностикум). Планшет оставляют на 2-2,5 ч при комнатной температуре. Учет результатов: в положительной пробе формируются «зонтики», в отрицательной – «пуговки». Чувствительность РНГА составляет ~ 50 мкг/мл ботулотоксина.

**При постановке биопробы (БП)** экстракты из исследуемого материала делят на 2 части. Одну из них кипятят на водяной бане в течение 20-30 мин для разрушения токсина. Каждый образец кипяченого и некипяченого материала вводят двум мышам внутрибрюшинно по 0,5 мл или подкожно по 1,0 мл. Если в материале содержится ботулинический токсин, животные, получившие некипяченый образец, погибают, а получившие кипяченый – остаются живыми. Чувствительность БП составляет ~30 – 40 пг/мл ботулотоксина.

Если опытные мыши погибают, а контрольные остаются живыми, выдают ответ о наличии в пробе ботулинического токсина (без указания его типа). Окончательный ответ может быть дан только по результатам биопробы, поскольку гибель мышей указывает на нали-

чие активного токсина, а РНГА – только на наличие специфического белка вне зависимости от того, утратил он свою активность или нет.

Идентификация ботулотоксина состоит в определении его типа путем постановки реакции нейтрализации токсина с диагностическими противоботулиническими сыворотками. Для постановки реакции нейтрализации с моновалентными ботулиническими сыворотками типов А, В, Е (остальные типы встречаются редко) исследуемый материал вводят двум мышам внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл, а остальным мышам – попарно в смеси с моновалентными противоботулиническими сыворотками (200-250 АЕ). Для определения ботулотоксина типа Е пробу, перед введением биопробному животному, необходимо обработать трипсином или панкреатином (на 1 мл пробы – 0,1 мл 1 % трипсина или панкреатина) с последующей экспозицией при температуре 37 °С в течение 1 ч. Все белые мыши должны погибнуть, за исключением той пары, которая получила смесь пробы с сывороткой, нейтрализовавшей токсин в пробе.

Следует иметь в виду, что при подозрении на ботулизм, когда необходимо немедленное лечение, постановка биологической пробы с использованием белых мышей может быть достаточно продолжительным (до 72 ч и более) методом диагностики. Успех лечения больных антитоксином напрямую зависит от времени его введения: если токсин уже связался с рецепторами на поверхности пресинаптической мембраны двигательных нейронов периферической нервной системы и вызвал в нейронах протеолиз белков, входящих в состав аппарата нейроэкзоцитоза, то время упущено и лечение будет неэффективным.

**Индикация биологических токсинов с использованием иммунохроматографического анализа.** В последнее время для индикации ботулинического токсина и стафилококкового энтеротоксина В (СЭВ) активно используются коммерческие иммунохроматографические тест-системы производства США, Германии, Канады, России, позволяющие получить ответ в течение 30 мин от начала исследования.

В состав укладки иммунохроматографических элементов производства России входят: индикаторный иммунохроматографический элемент (ИИХЭ) для выявления БТ типов А и В с чувствительностью выявления не менее 20 и 30 нг/мл; ИИХЭ для выявления СЭВ с чувствительностью выявления не менее 30 нг/мл. Ход проведения ИХА представлен в разделе «Имунохроматографический анализ». Для окончательного подтверждения выявления БТ необходимо про-

вести биологическую пробу на белых мышах, которая до настоящего времени считается «золотым стандартом» детекции БТ (несмотря на продолжительность наблюдения за биопробными животными), чувствительность которой около 30 пг/мл.

### СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ИНДИКАЦИЯ СТАФИЛОКОККОВОГО ЭНТЕРОТОКСИНА В (СЭВ)

Специфическую индикацию СЭВ проводят с применением РНГА или ИФА путем исследования нативных проб (жидкой фазы пробы) из окружающей среды или клинического материала от больных. СЭВ аккумулируется в моче и может быть выявлен в течение нескольких часов после попадания в организм. Исследованию от больного подлежат моча, смывы из носа и респираторные секреты (при ингаляции токсина). Для постановки РНГА и ИФА используют моновалентные эритроцитарные иммуноглобулиновые или иммуноферментные иммуноглобулиновые диагностикумы к стафилококковым энтеротоксинам.

К стафилококковым энтеротоксинам чувствительны обезьяны, котята, кролики, белые крысы и щенки. В качестве биологической пробы могут быть использованы молодые белые мыши массой не более 18-20 г. Исследуемый материал вводят мышам внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл. При наличии в исследуемом материале энтеротоксина у животных быстро развиваются рвота и понос, возможна гибель. Наблюдают за биопробными животными в течение 4-6 ч. Если на протяжении этого срока реакция у животных будет отсутствовать, биологическая проба считается отрицательной.

Идентификация СЭВ состоит в определении токсина путем постановки реакции нейтрализации с диагностической моновалентной антитоксической сывороткой В на белых мышах. Для этого материал вводят двум мышам внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл, а двум – в смеси с моновалентной антитоксической сывороткой В (200-250 АЕ).

При наличии в образце токсина типа В погибнут контрольные мыши, в живых останутся мыши, которым вводили исследуемый материал в смеси с моновалентной антитоксической сывороткой.

### СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ИНДИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ

Чума – зоонозная природно-очаговая особо опасная карантинная бактериальная инфекционная болезнь с трансмиссивным механизмом передачи возбудителя. По данным ВОЗ ежегодно в мире регистрирует-

ся более 2000 случаев заболевания чумой, многие из которых заканчиваются летальным исходом. Согласно СанПиН 3.3686-21 возбудитель чумы относится к микроорганизмам I группы патогенности.

Обнаружение возбудителя чумы на I этапе исследования по схеме специфической индикации осуществляется при помощи табельных методов – МФА, ПЦР, ИФА, РНГА, ИХА. Чувствительность МФА, РНГА, РАО составляет от  $n \times 10^5$  м.к. в мл и выше. При отсутствии иммуноглобулиновых эритроцитарных диагностикумов можно вместо РНГА ставить реакцию агломерации объемную (РАО) с диагностикумами на полимерных сферических носителях. РАО ставится по той же схеме, что и реакция с эритроцитарными диагностикумами. Иммуносерологические методы позволяют выявлять только капсульные формы чумного микроба.

**Световая микроскопия.** *Y. pestis* – овоидная грамотрицательная палочка, длиной 1-3 мкм, толщиной 0,5-0,7 мкм, с закругленными концами и утолщенной серединой. Хорошо окрашивается всеми анилиновыми красками. Характерен полиморфизм. Особым полиморфизмом отличаются мазки, приготовленные из бубона и органов больного при затяжном заболевании, из органов загнившего животного, а также объектов окружающей среды. Возбудитель чумы может принимать различную форму: веретенообразную, дрожжеподобную, грушевидную, шаров различной величины, а также теней.

**МФА.** Постановка МФА осуществляется вышеописанным способом (прямой метод с контрастированием неспецифического свечения альбумином, меченым родамином) с использованием «Иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих чумных, адсорбированных лошадиных, лиофилизат для диагностических целей» (выпускает ФКУН РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора).

Препарат предназначен для выявления и идентификации возбудителя чумы в капсульной и бескапсульной формах в мазках из различных материалов и чистых культур.

При исследовании материала из внешней среды одновременно готовят мазки из нативного материала и мазки из материала после обогащения пробы. Для обогащения пробу фильтруют через мембранные фильтры с диаметром пор 0,45  $\mu$  или центрифугируют при 3 тыс. об/мин, или подрачивают на бульоне Хоттингера рН 7,2 $\pm$ 0,2 при температуре 37 $\pm$ 1  $^{\circ}$ С в течение 24-48 часов. Из каждого объекта готовят не менее 3 мазков.

**ПЦР** – ускоренный метод диагностики чумы, направленный на выявление генетических маркеров возбудителя. Чувствительность метода  $1 \times 10^3$  м.к./мл, время выполнения анализа 6-12 ч.

Основные направления применения ПЦР в диагностике чумы:

- индикация возбудителя, выделенного из клинического, патолого-анатомического, полевого, материалов, объектов окружающей среды;
- идентификация возбудителя;
- определение эпидемической значимости возбудителя;
- определение плазмидного профиля штаммов чумного микроба.

ПЦР-анализ выполняется в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями по профилактике инфекционных болезней СанПиН 3.3686-21 и МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Для индикации чумного микроба используют следующие коммерческие наборы:

с электрофоретическим учетом результатов:

– «Тест-система для выявления ДНК *Yersinia pestis* методом полимеразной цепной реакции (ГенПест)» (выпускает ФКУН РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора);

с учетом результатов в режиме реального времени:

– Набор реагентов для выявления ДНК *Yersinia pestis* методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом в режиме реального времени «Ген *Yersinia pestis* индикация – РФФ» (выпускает ФКУН РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора);

– Набор реагентов для ускоренной идентификации штаммов *Yersinia pestis* методом мультилокусной полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени «Ген *Yersinia pestis* идентификация – РФФ» (выпускает ФКУН РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора);

– Набор реагентов для выявления ДНК *Yersinia pestis* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Yersinia pestis*-FL» (выпускает ФБУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора, ООО «ИнтерЛаб-Сервис»);

– Набор реагентов для выявления и идентификации ДНК возбудителя чумы методом полимеразной цепной реакции в реальном време-

ни «ОМ-Скрин-Чума-РВ» (выпускает НПК «СИНТОЛ»);

– Набор реагентов для выявления ДНК возбудителей чумы, сибирской язвы и туляремии методом ПЦР в режиме реального времени «MULTI-FLU» (выпускает ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора).

Забор материала на исследование от человека, животных, насекомых и объектов окружающей среды, условия хранения и перевозки предварительно обработанных проб, а также порядок обработки и обеззараживания исследуемого материала, содержащего (подозрительного на содержание) микроорганизмы I-IV групп патогенности, при проведении работ с использованием амплификационных технологий подробно описаны в Приложении 1 и Приложении 2.

**Выделение ДНК.** Выделение ДНК осуществляют методом нуклеосорбции на силикагеле в присутствии гуанидинизотиоцианата с использованием коммерческих наборов типа «ДНК-сорб В», «Рибо-сорб» и т.п., а также методом преципитации – набор «Рибо-преп». Работу проводят в соответствии с инструкциями к комплектам реагентов. Во время экстракции ДНК дополнительно могут использоваться контрольные образцы (ОКО, ВКО, ПКО), в случае, если они входят в состав применяемой ПЦР тест-системы.

«Тест-система для выявления ДНК *Yersinia pestis* методом полимеразной цепной реакции (ГенПест)»

Тест-система предназначена для выявления ДНК *Yersinia pestis* в клиническом материале, органах животных и объектах внешней среды.

Принцип метода: метод основан на использовании полимеразной цепной реакции (ПЦР), представляющей собой повторяющиеся циклы синтеза – амплификацию специфической области ДНК-мишени в присутствии ДНК-полимеразы, дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, буферного раствора и олигонуклеотидных праймеров, распознающих ДНК-мишень. Учет результатов – обнаружение полосы свечения ДНК после электрофореза при визуализации агарозного геля в проходящем ультрафиолете.

Аналитические характеристики:

Праймеры F21 и F22 обеспечивают специфичную амплификацию фрагмента ДНК размером 306 п.н., соответствующего нуклеотидной последовательности структурного гена *caf1*, ответственного за синтез капсульного антигена и локализованного на плазмиде чумного микроба rFra/rMT1. Праймеры PlaY1 и PlaY2, обеспечивают специфичную амплификацию фрагмента ДНК размером 480 п.н., соответ-

ствующего нуклеотидной последовательности структурного гена *pla*, ответственного за синтез активатора плазминогена и локализованного на плазмиде чумного микроба pPst/pPCP1.

Тест-система выявляет в ПЦР  $1 \times 10^3$  м.к./мл *Y. pestis*, обладающих генами *caf1* (плазида pFra) и *pla* (плазида pPst).

Проведение анализа осуществляют согласно инструкции производителя.

Электрофорез проводят в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора в течение 30-40 мин, при градиенте напряжения 10 В/см до прохождения лидирующего красителя 2/3 длины трека.

**Оценка результатов ПЦР.** По окончании электрофореза агарозный гель извлекают из камеры и помещают на 10 мин в ванночку с раствором этидиум бромид в концентрации 0,5 мкг/мл для окрашивания ПЦР-продуктов.

Результат проведения ПЦР регистрируют и документируют в проходящем ультрафиолете с использованием документирующей видеосистемы или зеркального фотоаппарата с пленкой типа «Микрат» 300.

Результаты оценивают по наличию фрагментов ДНК, полосы которых располагаются на том же уровне в геле, что и полосы в положительном контроле с препаратом ДНК. Для возбудителя чумы, содержащего геномы *caf1* (плазида pFra/pMT1) и *pla* (плазида pPst/pPCP1), выявляются полосы 306 н.п. и 480 н.п. (рисунок 1). Возможное наличие лишь одного фрагмента указывает на то, что в образце обнаружен возбудитель чумы, в геноме которого имеется только одна из выявляемых видоспецифичных плазмид: pFra/pMT1 или pPst/pPCP1.

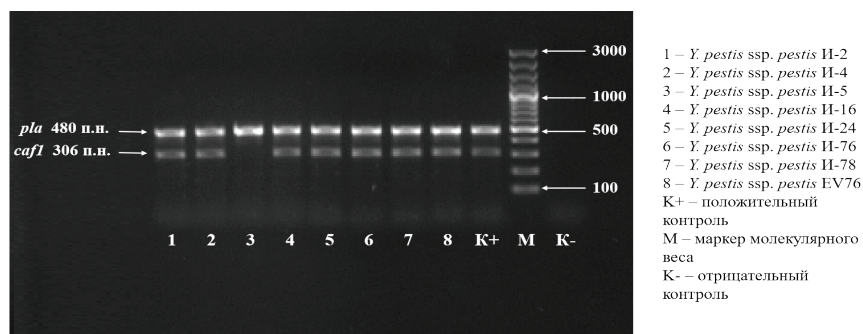


Рисунок 1. Результаты ПЦР с использованием тест-системы «ГенПест» для обнаружения ДНК чумного микроба с электрофоретическим учетом результатов

Отрицательный контроль – полоса на уровне положительного контроля должна отсутствовать; наличие полосы свидетельствует о контаминации компонентов тест-системы.

Наличие полос, располагающихся выше или ниже контрольной, является неспецифичным ответом и во внимание не принимается.

«Набор реагентов для выявления ДНК *Yersinia pestis* методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени (Ген *Yersinia pestis* индикация – РГФ)» предназначен для выявления ДНК чумного микроба в пробах биологического материала и объектов окружающей среды методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени.

Проведение ПЦР – амплификации ДНК осуществляют согласно инструкции производителя.

Для работы с прибором «Rotor-Gene» 3000 используют программу «Rotor-Gene 6», с прибором «Rotor-Gene 6000» – программу «Rotor-Gene 6000» версии 1.7.

Детальное проведение анализа и регистрация результатов амплификации по каналу FAM/Green описаны в инструкции к амплификатору.

**Учет результатов.** Результаты учитывают на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов) (рисунок 2).

Пороговое значение Ct для положительных проб по каналу FAM составляет не более 33. Если значение (Ct) более 33, требуется повторить ПЦР. Если при повторном исследовании получено значение (Ct) не более 33, результат считают положительным (таблица 2). При повторном получении значение (Ct) более 33, требуется повторить весь анализ, начиная с этапа подготовки проб.

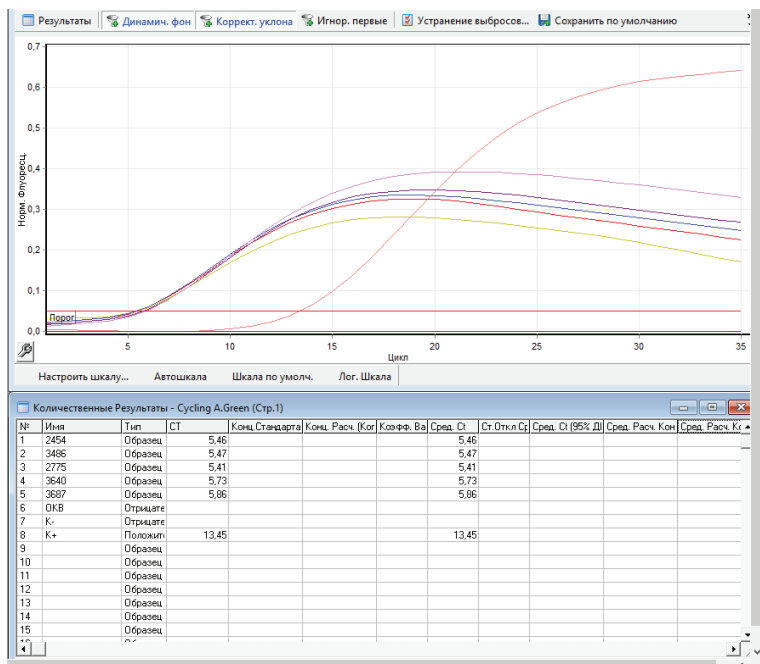


Рисунок 2. Результаты ПЦР с использованием тест-системы «Ген *Yersinia pestis* индикация – РГФ» для обнаружения ДНК чумного микроба в режиме «реального времени»

**Таблица 2**  
**Учет результатов к тест-системе «Ген *Yersinia pestis* индикация – РГФ»**

Значение порогового цикла, Ct по каналу для флуорофора FAM (ген <i>yihN</i> )	Интерпретация
Исследуемые образцы	
≤ 33	ДНК <i>Yersinia pestis</i> обнаружена
Значение отсутствует	ДНК <i>Yersinia pestis</i> не обнаружена
Контрольные образцы	
<b>В</b>	Корректный результат для ОКО
Значение отсутствует	Корректный результат для К-
≤ 33	Корректный результат для К+

«Набор реагентов для ускоренной идентификации штаммов *Yersinia pestis* методом мультилокусной полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени (Ген *Yersinia pestis* идентификация – РГФ)» предназначен для видовой идентификации штаммов чумного микроба, определения плазмидного профиля и дифференцирования авирулентных изолятов от вирулентных методом мультилокусной полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов.

Определение видовой принадлежности исследуемых культур проводится на основании амплификации специфичных для *Y. pestis* фрагментов: локус *Za* (хромосома), ген *cafI* (плазмида pFra/pMT1), ген *pla* (плазмида pPst/pPCP1). Дифференцирование авирулентных штаммов чумного микроба от вирулентных осуществляется на основании выявления генов *irp2* (остров высокой патогенности хромосомной области пигментации), *hmsH* (*hms*-локус хромосомной области пигментации), *IcrV* (плазмида pCad/pCD1). В качестве маркеров наличия плазмид *Y. pestis* используются гены *cafI* (плазмида pFra/pMT1), *pla* (плазмида pPst/pPCP1), *IcrV* (плазмида pCad/pCD1).

**Проведение ПЦР** осуществляют согласно инструкции производителя.

Для работы с прибором «Rotor-Gene» 3000 используют программу «Rotor-Gene 6», с прибором «Rotor-Gene» 6000 – программу «Rotor-Gene 6000» версии 1.7

Программирование амплификатора, регистрация и учет результатов амплификации по каналам FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange описаны в инструкции по применению «Ген *Yersinia pestis* идентификация – РГФ».

### **Учет результатов**

Результаты учитывают на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствует наличию или отсутствию значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе в таблице результатов).

Пороговое значение Ct для положительных проб по каналу FAM, JOE, ROX составляет не более 33. Если значение (Ct) более 33, требуется повторить ПЦР. Если при повторном исследовании получено значение (Ct) не более 33, результат считают положительным. При повторном получении значения (Ct) более 33, требуется повторить весь анализ, начиная с этапа подготовки проб.

Учет результатов, полученных с ПЦР-смесью «К1» и «К2», проводится по отдельности. В случае получения положительных результатов со смесью «К1» проводят учет результатов, полученных со смесью «К2». В случае отрицательного результата со смесью «К1» учет результатов, полученных со смесью «К2», не проводят.

Учет результатов проводится в 3 этапа:

1. Определение видовой принадлежности исследуемых культур;
2. Дифференцирование авирулентных штаммов чумного микроба от вирулентных;
3. Определение плазмидного профиля изолятов *Yersinia pestis*.

Определение видовой принадлежности исследуемых культур

Учет результатов проводится в соответствии с приведенной таблицей 3. Анализ проводится на основании регистрации сигналов по каналам FAM, JOE, ROX с ПЦР-смесью «К1».

**Таблица 3**

**Определение видовой принадлежности исследуемых культур**

Смесь «К1», значение порогового цикла, Ct			Интерпретация
FAM (ген <i>pla</i> )	JOE (ген <i>3a</i> )	ROX (ген <i>cafI</i> )	
Исследуемые образцы			
≤ 33	≤ 33	≤ 33	ДНК <i>Yersinia pestis</i> обнаружена
≤ 33	≤ 33	Значение отсутствует	
Значение отсутствует	≤ 33	≤ 33	
Значение отсутствует	≤ 33	Значение отсутствует	
Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует	ДНК <i>Yersinia pestis</i> не обнаружена
Контрольные образцы			
Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Корректный результат для ОКВ
Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Корректный результат для К-
≤ 33	≤ 33	≤ 33	К о р р е к т н ы й результат для К+

Дифференцирование авирулентных штаммов чумного микроба от вирулентных

Учет результатов проводится в соответствии с приведенной таблицей 4. Анализ проводится на основании регистрации сигналов по каналам FAM, JOE, ROX с ПЦР-смесью «K2».

Таблица 4

**Дифференцирование авирулентных штаммов чумного микроба от вирулентных**

Смесь «K2», значение порогового цикла, <i>Ct</i>			Интерпретация
FAM (ген <i>hmsH</i> )	JOE (ген <i>irp2</i> )	ROX (ген <i>lcrV</i> )	
Исследуемые образцы			
≤ 33	≤ 33	Значение отсутствует	Штамм <i>Yersinia pestis</i> <b>авирулентный</b>
≤ 33	Значение отсутствует	≤ 33	
≤ 33	Значение отсутствует	Значение отсутствует	
Значение отсутствует	≤ 33	Значение отсутствует	
Значение отсутствует	Значение отсутствует	≤ 33	
Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует	
≤ 33	≤ 33	≤ 33	Штамм <i>Yersinia pestis</i> <b>вирулентный</b>
Контрольные образцы			
Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Корректный результат для <b>ОКВ и К-</b>
≤ 33	≤ 33	≤ 33	Корректный результат для <b>К+</b>

**Определение плазмидного профиля изолятов *Yersinia pestis***

Учет результатов проводится в соответствии с приведенной таблицей 5. Анализ проводится на основании регистрации сигналов по каналам FAM и ROX с ПЦР-смесью «K1» и каналу ROX с ПЦР-смесью «K2».

Таблица 5

Определение плазмидного профиля изолятов *Yersinia pestis*

Смесь «К1»		Смесь «К2»	Интерпретация
FAM (ген <i>pla</i> )	JOE (ген <i>cafI</i> )	ROX (ген <i>lcrV</i> )	
Исследуемые образцы			
≤ 33	≤ 33	≤ 33	pPCP1, pMT1, pCD1
≤ 33	Значение отсутствует	≤ 33	pPCP1, pCD1
Значение отсутствует	≤ 33	≤ 33	pMT1, pCD1
≤ 33	≤ 33	Значение отсутствует	pPCP1, pMT1
Значение отсутствует	Значение отсутствует	≤ 33	pCD1
≤ 33	Значение отсутствует	Значение отсутствует	pPCP1
Значение отсутствует	≤ 33	Значение отсутствует	pMT1
Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует	<b>Плазмиды отсутствуют</b>
Контрольные образцы			
Значение отсутствует	Значение отсутствует	Значение отсутствует	Корректный результат для ОКВ и К-
≤ 33	≤ 33	≤ 33	Корректный результат для К+

«Набор реагентов для выявления ДНК *Yersinia pestis* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией (АмплиСенс® *Yersinia pestis-FL*)»

Выявление *Yersinia pestis* включает экстракцию ДНК из образцов биологического материала и проведение ПЦР-амплификации участка ДНК данного микроорганизма с гибридационно-флуоресцентной детекцией, которая производится непосредственно в ходе ПЦР. Экстракция ДНК из биологического материала проводится в присутствии внутреннего контрольного образца (ВКО STI-87), который позволяет контролировать выполнение процедуры исследования для каждого образца. Затем с полученными пробами ДНК проводится реакция амплификации участка ДНК *Yersinia pestis* при помощи специфичных к

этому участку ДНК праймеров и фермента TaqF-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствует флуоресцентно-меченый олигонуклеотидный зонд, который гибридизуется с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфических продуктов амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентных сигналов. Детекция флуоресцентных сигналов при использовании формата FRT происходит непосредственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени».

**Проведение ПЦР** осуществляют согласно инструкции производителя.

**Учет результатов.** Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения прибора, используемого для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам:

1. По каналу для флуорофора FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК ВКО STI-87;

2. По каналу для флуорофора JOE регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации ДНК *Yersinia pestis*.

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла «С<sub>t</sub>» (рисунок 3) в соответствующей графе в таблице 7 результатов.

Принцип интерпретации результатов следующий:

1. ДНК *Yersinia pestis* обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла С<sub>t</sub>, не превышающее граничное значение, указанное во вкладыше. При этом кривая флуоресценции каждой исследуемой пробы должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.

2. ДНК *Yersinia pestis* не обнаружена, если для данной пробы в таблице результатов по каналу для флуорофора FAM определено значение порогового цикла С<sub>t</sub>, не превышающее указанное (граничное) значение, а по каналу JOE не определено значение порогового цикла С<sub>t</sub>.

3. Результат анализа невалидный, если для данной пробы не определено (отсутствует) значение порогового цикла  $C_t$  по каналу JOE и по каналу FAM значение  $C_t$  также не определено (отсутствует) или превышает указанное граничное значение. В этом случае требуется повторно провести ПЦР-исследование соответствующего клинического образца, начиная с этапа экстракции.

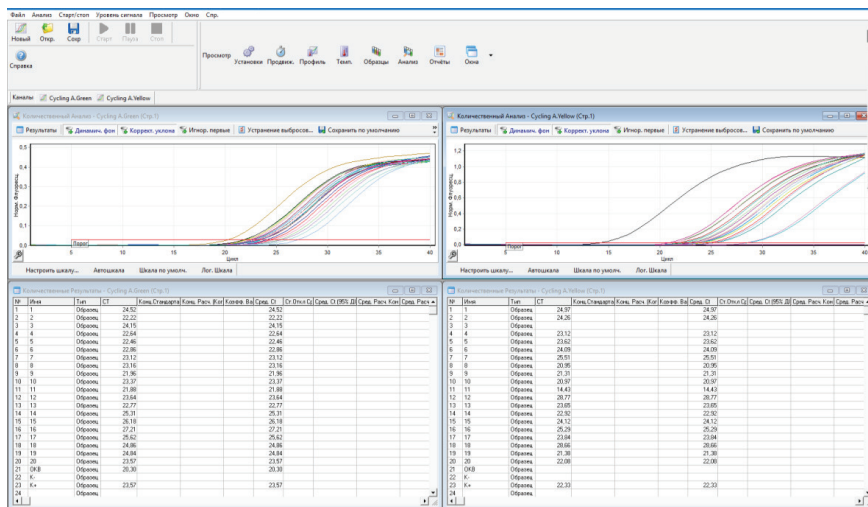


Рисунок 3. Результаты ПЦР с использованием тест-системы «АмплиСенс® *Yersinia pestis*-FL» для обнаружения ДНК чумного микроба в режиме «реального времени»

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей амплификации и отрицательного контроля экстракции ДНК, в соответствии с таблицей 6 оценки результатов контрольных реакций:

Таблица 6  
Интерпретация результатов ПЦР для обнаружения ДНК чумного микроба в режиме «реального времени»

Значение порогового цикла, $C_t$		Интерпретация
по каналу для флуорофора JOE (целевой продукт)	по каналу для флуорофора FAM (ВКО STI-87)	
Исследуемые образцы		
Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	ДНК <i>Yersinia pestis</i> обнаружена

Значение порогового цикла, Ct		Интерпретация
по каналу для флуорофора JOE (целевой продукт)	по каналу для флуорофора FAM (ВКО STI-87)	
Значение отсутствует	Определено значение меньше граничного	ДНК <i>Yersinia pestis</i> не обнаружена
Значение отсутствует	Значение отсутствует	Результат анализа невалидный
Контрольные образцы		
Значение отсутствует	Определено значение меньше граничного	Корректный результат для <b>ОКО</b>
Значение отсутствует	Значение отсутствует	Корректный результат для <b>К-</b>
Определено значение меньше граничного	Определено значение меньше граничного	Корректный результат для <b>К+</b>

Если для положительного контроля ПЦР (К+) значение порогового цикла по каналу для флуорофора JOE отсутствует или превышает граничное значение, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых не обнаружена ДНК *Yersinia pestis*.

Если для отрицательного контроля экстракции ДНК (ОК) по каналу для флуорофора JOE определено значение порогового цикла Ct, необходимо повторить ПЦР-исследование для всех образцов, в которых обнаружена ДНК *Yersinia pestis*.

Если для отрицательного контроля ПЦР (К-) по каналам FAM и/или JOE определено значение порогового цикла Ct, необходимо повторить амплификацию для всех образцов, в которых обнаружена ДНК *Yersinia pestis*, с постановкой К – не менее чем в трех повторах.

ИФА проводится по описанной выше схеме с использованием «Тест-системы дот-иммуноферментной для детекции чумного микроба моноклональной ИФА ПестФ1-М» (выпускает ФКУН РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора).

Принцип действия. В основу метода положена схема сэндвич-варианта ИФА. При постановке ИФА капсульный антиген чумного микроба, содержащийся в исследуемом материале, специфически взаимодействует с чумными моноклональными мышиными иммуноглобулинами, сорбированными на пластике. Образовавшийся комплекс «антиген-антитело» выявляют с помощью конъюгата (чумные моноклональные иммуноглобулины, меченые пероксидазой хрена).

Визуализация реакции происходит после добавления субстрат-индикаторного раствора. При этом в присутствии пероксидазы происходит образование стабильного комплекса, придающего раствору зелено-голубую окраску с максимумом поглощения при длине волны 405 нм.

Тест-система выявляет капсулосодержащие штаммы *Y. pestis* в количестве  $1 \times 10^6$  м.к./мл.

Материал для исследования:

- суспензии культур чумного микроба или подозрительных изолятов;
- плазма крови или сыворотка крови людей;
- пробы органов умерших людей, лабораторных и диких животных.

Обеззараживание материала. К образцам сыворотки крови или плазмы крови добавляют мертиолят натрия до конечной концентрации 1:10 000 (0,01 %) и прогревают при температуре  $56 \pm 1$  °С в течение 30 мин. Исследуемые образцы микробных взвесей, суспензии органов лабораторных и диких животных инактивируют добавлением формалина до конечной концентрации 2 или 4 % с последующей экспозицией 12 ч или 1 ч (соответственно) при температуре  $20 \pm 2$  °С. После выполнения данного этапа материал считается обеззараженным.

Проведение анализа. Приготовление рабочих растворов проводят согласно инструкции к тест-системе.

В лунки планшета в дубликатах вносят по 100 мкл исследуемого материала: сыворотку и плазму крови – без предварительного разведения, суспензию органов – в разведении 1:10, взвеси микробных клеток – в концентрации  $1 \times 10^7$  м.к./мл. В качестве положительного контроля вносят 100 мкл раствора ПКО-ЧМ в одну лунку, а в качестве отрицательного – по 100 мкл фосфатно-солевого буфера (ФСБ) в три лунки.

Планшет накрывают крышкой и инкубируют при температуре  $37 \pm 1$  °С в течении 60 мин. По окончании инкубации планшет вынимают из термостата и удаляют содержимое из лунок в емкость для отработанных жидкостей. Лунки планшета промывают добавлением 200 мкл ФСБ 3-кратно при тестировании чистых культур и 5-6-кратно – при тестировании биологического материала.

В лунки вносят по 100 мкл приготовленного рабочего раствора конъюгата. Планшет закрывают крышкой и инкубируют при температуре  $37 \pm 1$  °С в течении 60 мин. Далее лунки планшета шестикратно промывают ФСБ, как описано выше.

Во все лунки вносят по 100 мкл субстратной смеси и выдерживают при температуре  $20 \pm 1$  °С в течении 12 мин, после чего производят учет результатов.

При невозможности своевременного учета допускается добавление в лунки 50 мкл 0,1 М раствора натрия гидроксида в качестве стоп-реагента, после чего планшет помещают в холодильник при температуре  $5 \pm 1$  °С. Учет результатов осуществляют в течение 2 ч.

**Учет результатов.** Регистрацию результатов анализа осуществляют с использованием мультиканального фотометра при длине волны 405 нм. Перед началом учета содержимое лунок перемешивают осторожным постукиванием по планшету до получения гомогенного зелено-голубого раствора.

Реакция подлежит учету при условии появления зелено-голубого окрашивания в лунке с положительным контрольным образцом, а также отсутствии или наличии слабого зеленоватого окрашивания в отрицательном контроле. При этом значение оптической плотности (ОП) положительного контроля должно не менее чем в 3 раза превышать таковое отрицательного контроля. При инструментальном учете измеряют ОП в лунках, рассчитывают среднее арифметическое значение в лунках с отрицательным контрольным образцом – ОП<sub>ср(К-)</sub>. Для учета результатов реакции используют таблицу 7.

**Таблица 7**

**Учет результатов ИФА**

Образец (лунки планшета)	Регистрируемое значение ОП	Результат анализа
Отрицательный контроль – ФСБ	$< 0,1$	Результаты анализа подлежат учету
	$\geq 0,1$	Результаты анализа не подлежат учету. Ложноположительный результат
Положительный контрольный образец «ПКО-ЧМ»	$\geq \text{ОП}_{\text{ср(К-)}} \times 3$	Результаты анализа подлежат учету
	$< \text{ОП}_{\text{ср(К-)}} \times 3$	Результаты анализа не подлежат учету. Ложноотрицательный результат
Пробы	$< \text{ОП}_{\text{ср(К-)}} \times 2$	В пробе не выявлен капсулосодержащий штамм <i>Y. pestis</i>
	$\geq \text{ОП}_{\text{ср(К-)}} \times 2$	В пробе выявлен капсулосодержащий штамм <i>Y. pestis</i>

**ИХА.** Для постановки анализа используют «Набор реагентов для иммунохроматографического экспресс-выявления и идентификации возбудителя чумы (ИХ тест-система *Y. pestis*)» – выпускает ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора (Рисунок 4).

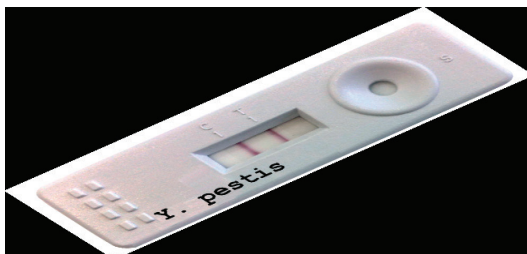


Рисунок 4. Диагностическая панель «ИХ тест-система *Y. pestis*»

Специфической мишенью индикаторной тест-системы на основе ИХ метода является капсульный антиген (F1) возбудителя чумы, поэтому тест-система дает возможность экспресс-выявления и идентификации не только капсулосодержащих штаммов *Y. pestis*, но и капсульного антигена в пробах из объектов окружающей среды.

*Привлекательность данного метода состоит в простоте постановки, экспрессности (учет результатов через 15-20 мин), в достаточно высокой чувствительности ( $10^7$  м.к./мл для микробных клеток и 0,1 мкг/мл для F1) и специфичности.*

*Анализируемые образцы:*

- суспензии, полученные из колоний микроорганизмов, выращенных на агаре Хот-тингера с добавлением крови;
- суспензии, полученные из объектов внешней среды после пробоподготовки.

*Порядок работы:*

1. Проводят концентрирование пробы одним из известных методов; при работе с исследуемой культурой готовят взвесь  $1 \times 10^9$  м.к./мл в ФБР (0,01 % натрий-фосфатный буфер, pH 7,4) по ОСО 10 единиц.
2. Прогревание на водяной бане при температуре 56 °С в течение 30 мин.
3. Панель теста помещают в чашку Петри и пипеткой вносят 0,1 мл материала в лунку тест системы.
4. Через 3 мин в лунку вносят 0,1 мл ФБР.
5. Учет результатов через 15 мин (появление двух окрашенных

полосок в «С» и «Т» зонах подтверждает наличие капсульного антигена возбудителя чумы в материале, появление окрашенной полоски только в «С» зоне – его отсутствие).

РНГА ставят вышеописанным способом с использованием Диагностикумов чумных эритроцитарных для выявления антигенов производства Казахского научного центра карантинных и зоонозных инфекций им. М. Айкимбаева, однако данные препараты государственной регистрации в Российской Федерации не имеют.

При постановке РАО по описанной выше схеме используют **«Иммуноглобулины диагностические чумные, адсорбированные лошадиные для реакции агглютинации на стекле»** (выпускает ФКУН РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора).

### СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ИНДИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ ХОЛЕРЫ

Холера – острое инфекционное заболевание из группы особо опасных инфекционных болезней, характеризующееся диарейным синдромом, фекально-оральным механизмом передачи возбудителя, водным, пищевым и контактно-бытовым путями распространения инфекции.

Возбудителями холеры являются холерные вибрионы O1 серогруппы (биовара классического и биовара Эль Тор) и серогруппы O139.

Холерные вибрионы O1 и O139 серогрупп, содержащие гены *ctxAB* и *tcpA-F*, вызывают заболевания холерой и являются эпидемически значимыми (токсигенными). Эпидемически незначимые (нетоксигенные) холерные вибрионы не содержат гены *ctxAB* и *tcpA-F*; могут вызывать спорадические (единичные) или групповые (при общем источнике инфицирования) заболевания, не склонные к эпидемическому распространению. Холерные вибрионы, у которых отсутствуют гены *ctxAB*, но имеются *tcpA-F*, относят к нетоксигенным штаммам.

Объектами исследования на холеру могут быть испражнения, рвотные массы, желчь, трупный материал (отрезки тонкого кишечника, желчный пузырь), различные предметы, загрязненные выделениями больного, вода, пищевые продукты, обитатели водоемов и другие объекты окружающей среды.

Забор, доставка и порядок исследования материала проводятся в соответствии с действующими методическими указаниями МУК 4.2.3745-22 «Методы лабораторной диагностики холеры» и МУК 4.2.3746-22 «Организация и проведение лабораторной диагностики холеры в лабораториях различного уровня».

При появлении первых случаев подозрения на заболевание холерой в обязательном порядке необходимо использовать методы индикации: ПЦР, МФА. Возможно также использование РНГА с эритроцитарным иммуноглобулиновым диагностикумом и ИФА (при наличии тест-систем). В качестве экспресс-методов используют реакцию имобилизации вибрионов (РИВ), реакцию агглютинации (РА).

**Световая микроскопия.** Холерные вибрионы – грамотрицательные аспорогенные полиморфные прямые или слегка изогнутые палочки, варьирующие в размерах (1,5-3,0 мкм в длину и 0,2-0,6 мкм в ширину), с одним полярно расположенным жгутиком. При окрашивании по Романовскому-Гимзе холерные вибрионы приобретают фиолетово-красный оттенок, при этом цитоплазма клеток голубого цвета, ядра – красного.

МФА позволяет обнаружить холерные вибрионы в концентрации  $\geq 10^5$  м.к. в 1 мл. Результаты исследований могут быть получены через 2–6 ч после поступления материала.

МФА используют для выявления антигенов холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп при исследовании нативного материала от больных с подозрением на холеру, с концентрированных на мембранных фильтрах пробах воды, а также на этапах накопления возбудителя в первой (6 ч) и второй пептонной воде (12 ч), и при наличии подозрительных колоний в посевах исследуемого материала. При отрицательном результате в МФА нативного материала осуществляется постановка анализа после подрачивания материала на 1 % пептонной воде.

Для иммунофлуоресцентной окраски используют холерные флуоресцирующие иммуноглобулины O1 и O139 серогрупп. В мазках из нативного материала и в культурах, выращенных на плотных питательных средах, вибрионы в основном имеют вид слегка изогнутых палочек с выраженным ярко флуоресцирующим ободком по всей периферии клетки. В препаратах, приготовленных из испражнений больного в острый период заболевания, холерные вибрионы нередко располагаются в виде «стайки рыб». В мазках из пептонной воды или бульона, приготовленных через 4-6 ч после посева, наряду с типичными по форме и размеру вибрионами, встречается большое количество крупных флуоресцирующих, нередко сцепленных между собой клеток различной степени изогнутости.

Имеются сообщения об использовании МФА для детекции возбудителя холеры в образцах испражнений и в пробах воды. Иммунофлуорес-

центный метод на основе поликлональных антител к белкам наружной мембраны *V. cholerae* O1 эффективен при выявлении соответствующего микроорганизма при концентрации 240 КОЕ/мл в образце.

Для детекции *V. cholerae* O139 в прямом МФА сконструирован диагностический препарат на основе поликлональных адсорбированных кроличьих иммуноглобулинов к О-антигену холерного вибриона гомологичной серогруппы. Продемонстрирована высокая чувствительность и специфичность моноклональных иммунофлуоресцентных препаратов как при идентификации чистых культур *V. cholerae* O139, так и индикации возбудителя в различном инфицированном материале. Для выявления холерных вибрионов O139 серогруппы можно использовать непрямой метод иммунофлуоресценции.

**Постановка анализа:** из нативного материала (жидких испражнений и рвотных масс), пленки I-ой и II-ой накопительной среды готовят мазок, подсушивают его на воздухе и фиксируют 20 мин в 96 ° этиловом спирте без последующего обжигания. Мазок помещают в чашку Петри с влажной фильтровальной бумагой или ватой и на мазок наносят каплю смеси, состоящей из холерной люминесцирующей сыворотки и альбумина, меченого родамином, в рабочем разведении. Через 20 мин экспозиции при  $37 \pm 0,5$  °C или комнатной температуре мазок промывают дважды по 5 мин в забуференном физиологическом растворе, трижды прополаскивают в дистиллированной воде и высушивают на воздухе.

На мазок наносят небольшую каплю забуференного глицерина (9 частей глицерина и 1 часть фосфатного буфера, pH 7,0) и накрывают покровным стеклом. При просмотре препаратов в люминесцентном микроскопе используют нефлуоресцирующее иммерсионное масло (при его отсутствии – диметилфтолат). Положительно оценивается интенсивное изумрудно-зеленое свечение по периферии клетки («++++») или «++++»).

При обнаружении специфического свечения в препаратах выдают предварительный положительный ответ.

**ПЦР.** Основным методом индикации возбудителя холеры в настоящее время является ПЦР, используемая для выявления ДНК микроорганизма при исследовании нативного материала от людей с подозрением на холеру, секционного материала, проб воды после ее концентрирования на фильтре или после центрифугирования и других объектов окружающей среды, а также этапах накопления возбудителя.

Основными коммерческими наборами для индикации холерного вибриона являются:

– Набор реагентов для выявления ДНК *Vibrio cholerae* и идентификации патогенных штаммов *Vibrio cholerae* в биологическом материале и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Vibrio cholerae*-FL» (выпускает ФБУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора);

– Набор реагентов для выявления и идентификации ДНК возбудителей холеры и брюшного тифа методом ПЦР-РВ «ОМ-Скрин-Холера/БТ-РВ» (выпускает НПК «СИНТОЛ»).

Забор материала на исследование от человека и объектов окружающей среды, условия хранения и перевозки предварительно обработанных проб, а также порядок обработки и обеззараживания исследуемого материала, содержащего (подозрительного на содержание) микроорганизмы I-IV групп патогенности, при проведении работ с использованием амплификационных технологий осуществляют в соответствии с МУ 1.3.2569-09 (см. Приложение 1 и Приложение 2).

Постановку ПЦР проводят в соответствии с требованиями действующих нормативно-методических документов и инструкциями по применению зарегистрированных наборов тест-систем по следующей схеме:

- выделение ДНК
- постановка ПЦР для выявления ДНК холерного вибриона.

**Выявление и идентификация *V. cholerae* методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»**

Идентификацию и оценку эпидемической значимости *V. cholerae* методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» проводят с использованием «Набора реагентов для выявления ДНК *Vibrio cholerae* и идентификации патогенных штаммов *Vibrio cholerae* в биологическом материале и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией («АмплиСенс® *Vibrio cholerae*-FL»).

Подготовка проб и выделение ДНК проводятся согласно инструкции к набору реагентов «ДНК-сорб-Б», «Рибо-преп».

Постановка реакции амплификации осуществляется согласно ин-

струкции к набору реагентов в мультиплексном формате в двух пробирках: «Скрин» – амплификация мишеней *ctxA* (FAM), *tcpA* (ROX) и ВКО (JOE), «Тип» – амплификация мишеней *hly* (JOE) – холерные вибрионы всех серогрупп, *wbeT* (FAM) – принадлежность к серогруппе O1, *wbfR* (ROX) – принадлежность к серогруппе O139. Для интерпретации результатов необходима постановка обеих реакций «Скрин» и «Тип».

**Учет результатов.** Результаты интерпретируют на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла «Ст» в соответствующей графе в таблице результатов (таблица 8).

**Достоверным результат считается только в случае получения валидных результатов прохождения положительных и отрицательных контролей амплификации и отрицательного контроля выделения ДНК.**

Таблица 8

**Интерпретация результатов ПЦР с использованием тест-системы для обнаружения ДНК холерного вибриона в режиме «реального времени»**

ПЦР-смесь-1-FRT <i>Vibrio cholerae</i> скрин			ПЦР-смесь-1-FRT <i>Vibrio cholerae</i> тип			Варианты холерного вибриона
Значение Ct по каналу						
FAM (ctxA)	JOE (ВКО)	ROX (tcpA)	FAM (O1)	JOE ( <i>V.cholerae</i> )	ROX (O139)	
<33	Любое значение или отсутствие	<33	<33	<33	Нет значений	<i>V. cholerae</i> O1 токсигенный
<33	Любое значение или отсутствие	<33	Нет значений	<33	<33	<i>V. cholerae</i> O139 токсигенный
Нет значений	<33	<33	<33	<33	Нет значений	<i>V. cholerae</i> O1 нетоксигенный, но содержащий <i>tcpA</i>

ПЦР-смесь-1-FRT <i>Vibrio cholerae</i> скрин			ПЦР-смесь-1-FRT <i>Vibrio cholerae</i> тип			Варианты холерного вибриона
Значение Ct по каналу						
FAM (ctxA)	JOE (BKO)	ROX (tcpA)	FAM (O1)	JOE ( <i>V.cholerae</i> )	ROX (O139)	
Нет значе- ний	<33	<33	Нет значений	<33	<33	<i>V. cholerae</i> O139 неток- сигенный, но содержащий <i>tcpA</i>
Нет значе- ний	<33	Нет значе- ний	<33	<33	Нет значе- ний	<i>V. cholerae</i> O1 нетокси- генный
Нет значе- ний	<33	Нет значе- ний	Нет значений	<33	<33	<i>V. cholerae</i> O139 неток- сигенный
Нет значе- ний	<33	Нет значе- ний	Нет значений	<33	Нет значе- ний	<i>V. cholerae</i> не O1/O139
Нет значе- ний	<33	Нет значе- ний	Нет значений	Нет значений	Нет значе- ний	<i>V. cholerae</i> не обнаружены

РНГА с иммуноглобулиновым эритроцитарным диагностикумом используют как метод индикации возбудителя холеры при исследовании проб клинического, секционного материала и объектов окружающей среды. Чувствительность РНГА колеблется в пределах  $10^5$ - $10^6$  м.к./мл. Метод позволяет выявлять холерные вибрионы без оценки их эпидемической значимости на тех же этапах исследования, что и МФА. Результаты исследований получают через 2-6 ч после поступления материала.

Чувствительность ИФА составляет  $5 \times 10^4$  м.к./мл. Метод используют при наличии тест-систем, позволяющих выявлять в исследуемом материале антигены холерных вибрионов. Результаты исследований могут быть получены через 5-6 ч от времени поступления материала.

РИВ (реакция иммобилизации вибрионов) относится к экспрессным методам иммунодиагностики холеры, позволяет бактериоскопически обнаружить возбудитель в течение нескольких минут при его концентрации не менее  $1 \times 10^5$  м.к./мл при исследовании нативного

материала или культуры вибрионов. При наличии в образце возбудителей холеры добавление к исследуемой капле О-агглютинирующей холерной сыворотки или моноклональных антител (МКА) вызывает обездвиживание отдельных микробных клеток и образование неподвижных микроагглютинатов немедленно или в течение 1-2 мин. Чувствительность реакции иммобилизации вибрионов под влиянием холерной О1 сыворотки составляет  $4,3 \times 10^5$  м.к./мл.

**Постановка реакции:** на предметное стекло наносят 2 капли исследуемого материала (испражнений, верхнего слоя I-ой или II-ой среды обогащения). Первую каплю накрывают покровным стеклом (контроль), ко второй добавляют каплю холерной О1-сыворотки в разведении 1:50, перемешивают и накрывают покровным стеклом. Раздавленные капли просматривают под микроскопом при увеличении 400-600х, используя фазово-контрастное устройство или конденсор темного поля.

При наличии в исследуемом материале холерных вибрионов в первой капле наблюдается характерная подвижность, во второй – подвижность вибрионов прекращается немедленно или в течение 1-2 мин.

Для определения принадлежности холерного вибриона к серовару можно использовать сыворотки Инаба и Огава в разведении 1:50. Реакция иммобилизации специфична и позволяет дать первый сигнальный ответ через 15-20 мин от начала исследования нативного материала. При отрицательном результате исследование повторяют после подрачивания в 1 % пептонной воде (ПВ).

В случае отрицательного результата необходимо провести аналогичное исследование с холерной сывороткой О139 серогруппы в разведении 1:5.

РА (реакция агглютинации) относится к экспресс-методам иммунодиагностики холеры. Для исследования нативного материала в РА в разведенные в 1 % ПВ в объеме 1 мл холерные сыворотки О1, Инаба, Огава (с 1:100 до титра) и контроль антигена (1 мл 1 % ПВ) добавляют 2-3 капли исследуемого материала. Контроль сыворотки: 1 мл в разведении 1:100 (без исследуемого материала). Учет реакции агглютинации через 1 ч. При положительном результате виден агглютинативный рост с просветлением среды при отсутствии агглютинации в контрольной пробирке. При отрицательном результате – гомогенное помутнение среды (наблюдение в течение 3 часов).

При положительных результатах РА и данных люминесцентной микроскопии выдается окончательный ответ.

## СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ИНДИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

Сибирская язва является острым инфекционным заболеванием животных (домашних и диких) и человека. Согласно классификации биологических агентов, вызывающих болезни человека, сибиреязвенный микроб относится к бактериям II группы патогенности (СанПиН 3.3686-21).

Специфическая индикация возбудителя сибирской язвы включает в себя:

- обнаружение ДНК в различных материалах на всех этапах исследования;
- выявление спор в нативном материале проб из окружающей среды;
- обнаружение вегетативных форм возбудителя в материале от больных людей (трупов) и от больных животных (трупов);
- обнаружение термоустойчивых высокоспецифичных полисахаридов клеточной стенки в загнившем материале, шерсти и шкурах животных.

В качестве основных методов специфической индикации на всех этапах исследования используют ПЦР, а также МФА с контрастированием неспецифического свечения, РНГА с сибиреязвенным антигеным и/или антигенным эритроцитарным диагностикумом.

Возможность использования для индикации возбудителя сибирской язвы метода ИФА в настоящее время ограничена в связи с отсутствием сертифицированных коммерческих тест-систем.

Чувствительность методов МФА и РНГА колеблется в пределах  $1,6-3,1 \times 10^6$  м.к./мл исследуемого материала, ПЦР –  $1 \times 10^3$  м.к./мл, ИХА –  $10^5-10^6$  м.к./мл.

Материал для исследования:

- а) от больных или подозрительных на заболевание людей, в зависимости от формы заболевания, – содержимое везикул, отделяемое карбункула или язвы, струнья, мокрота, кровь, спинномозговая жидкость, моча, испражнения, экссудаты;
- б) трупный материал – кровь, экссудаты, кусочки органов (селезенки, печени, лимфоузлов и др.);

- в) материал от животных;
- г) продовольственное сырье и продукты животного происхождения;
- д) объекты окружающей среды – почва, трава, фураж, подстилка, вода и т. д.

**Световая микроскопия.** Из поступившего патологического материала (от людей и животных) готовят несколько мазков, которые подсушивают на воздухе, фиксируют в спирте с добавлением 3 % перекиси водорода (во флакон наливают 180 мл этилового спирта и 20 мл 30 % пергидроля) не более 30 мин, после этого окрашивают по Граму (общепринятым методом) и на капсулу одним из методов (по Ребигеру, Михину и др.). В окрашенных мазках из патологического материала сибиреязвенный микроб представляет собой грамположительные палочки, располагающиеся короткими цепочками или парно. Концы палочек, обращенные друг к другу, резко обрублены, свободные концы обычно закруглены.

**Выявление капсулы по Ребигеру.** На всю поверхность фиксированного мазка пипеткой наносят раствор Ребигера (растворяют 15-20 г генцианвиолета в 100 мл 40 % формалина с экспозицией при комнатной температуре в течение нескольких часов, после чего фильтруют) и выдерживают 30-60 сек, затем промывают водой и высушивают. В мазках из свежего патологического материала капсула вокруг микроба окрашивается в розовый или красно-фиолетовый цвет, тело микробной клетки – в темно-фиолетовый. В мазках из крови и спинномозговой жидкости палочки с капсулой увеличены, края микроба закруглены.

**Выявление капсулы методом Михина.** Фиксированный в 96 ° этиловом спирте с 3 %  $H_2O_2$  в течение 30 мин мазок окрашивают синькой Леффлера в течение 2-3 мин, подогревая до появления паров. Краску быстро смывают водой, а мазок высушивают бумагой. Краску необходимо смывать водой очень быстро, так как вода извлекает из капсулы красящее вещество. Капсулы – светло-розовые, бациллы – темно-синие.

Для обнаружения спор в некоторых образцах внешней среды мазки после фиксации окрашивают по Цилю-Нильсену или Пешкову.

**Обнаружение спор по Цилю-Нильсену.** На зафиксированный мазок кладут полоску фильтровальной бумаги и на нее наливают карболовый фуксин Циля. Мазок с краской подогревают на пламени

спиртовки до появления паров (но не до кипения) и краску оставляют на препарате без подогревания еще на 2-3 мин. Бумажку удаляют пинцетом, краску сливают, препарат промывают водой. Затем обесцвечивают 5 % серной кислотой до желтоватого оттенка (в течение 3-5 сек). Тщательно отмывают препарат водой, ополаскивают 5-10 сек 96 ° спиртом, а потом – водой. Докрашивают мазок метиленовой синью Леффлера 2-3 мин, смывают водой и просушивают. Препарат просматривают в микроскопе с иммерсионной системой. В мазках наблюдают палочки синего цвета. Споры, в зависимости от степени их жизнеспособности, могут окрашиваться следующим образом: 1) розовые с более интенсивной окраской по периферии – жизнеспособные; 2) равномерно окрашенные в красный цвет – слабо жизнеспособные; 3) синие – не жизнеспособные.

**Обнаружение спор по Пешкову.** Зафиксированный мазок окрашивают синькой Леффлера 20 сек, нагревая стекло над пламенем горелки до закипания краски. Далее мазок промывают водой и докрашивают 0,5 % водным раствором нейтрального красного в течение 30 сек. Краску смывают водой и мазок высушивают. Споры окрашиваются в голубой или синий цвет, вегетативные формы микробов – в розовый.

МФА позволяет обнаружить в исходных пробах сибиреязвенные микробы в вегетативной или споровой форме, для этого используют «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие сибиреязвенные вегетативные адсорбированные сухие» и Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие сибиреязвенные споровые адсорбированные сухие» (ФКУЗ «Ставропольский НИПЧИ Роспотребнадзора»).

Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие сибиреязвенные вегетативные адсорбированные сухие (ФКУЗ «Ставропольский НИПЧИ Роспотребнадзора») окрашивают вегетативные формы сибиреязвенного микроба. Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие сибиреязвенные споровые адсорбированные сухие (ФКУЗ «Ставропольский НИПЧИ Роспотребнадзора») очень интенсивно окрашивают споры сибиреязвенного микроба.

Для люминесцентной микроскопии делают мазки-отпечатки из экссудата брюшной полости и органов биопробных животных, мазки-отпечатки из отечной жидкости и внутренних органов людей и животных, мазки из подозрительных колоний, выросших из посе-

вов проб на чашках с питательными средами. В случае приготовления мазков непосредственно из нативного материала их окрашивают для увеличения контрастности смесью диагностических иммуноглобулинов с бычьим альбумином, меченым родамином.

Препараты покрывают покровными стеклами или просматривают extempore без покровных стекол. Для учета результатов используется арбитражная система оценки по интенсивности свечения и количеству специфически светящихся клеток:

«++++» – большое количество специфически светящихся клеток, расположенных длинными цепочками (вегетативная форма), очень яркая флуоресценция по периферии споры или вегетативной клетки, четко контрастирующая с темным телом клетки;

«+++» – яркая флуоресценция периферии клетки, клетки расположены отдельными группами (цепочками) и единично;

«++» или «+» – слабое свечение периферии клетки, не контрастирующее с ее телом.

Свечение спор и вегетативных клеток на 4+ и 3+ позволяет подозревать наличие в исследуемом материале возбудителя сибирской язвы и может служить основанием для выдачи предварительного положительного ответа.

Необходимо учитывать, что специфичность данного метода составляет не более 70 %, ввиду наличия перекрестно-реагирующих антигенов у представителей группы *Bacillus cereus*.

**ПЦР** позволяет детектировать одну (pX01) (тест-система производства ФКУН РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора) или обе плазмиды (pX01, pX02) вирулентности (ФБУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора), а также обе плазмиды и хромосому (НПК «Синтол») или только хромосому (ФБУН ГНЦ ПМБ) при исследовании нативного материала от людей и животных с подозрением на заболевание сибирской язвой, проб окружающей среды, а также чистых культур возбудителя. Использование ПЦР помогает при идентификации как типичных, так и измененных форм сибиреязвенного микроба.

Забор материала на исследование от человека и объектов окружающей среды, условия хранения и перевозки предварительно обработанных проб, а также порядок обработки и обеззараживания исследуемого материала, содержащего (подозрительного на содержание) микроорганизмы I-IV групп патогенности, при проведении работ с использованием амплификационных технологий осуществляют в соответствии с

МУ 1.3.2569-09 (см. Приложение 1 и Приложение 2).

### **Взятие материала из сырья животного происхождения и объектов окружающей среды для исследования методом ПЦР**

Взятие материала из сырья животного происхождения и из объектов внешней среды проводится в тех случаях, когда необходимо установить источник инфекции или фактор передачи, для выявления обсемененности спорами возбудителя сибирской язвы отдельных объектов, а также в целях обнаружения микроба в местах старых скотомогильников при проведении строительных, мелиоративных, гидротехнических и других работ, связанных с выемкой и перемещением грунта.

Мясо и мясные продукты: из материала, доставленного на исследование, отбирают образцы весом 10-30 г, из мяса – участки с лимфоидной тканью или кровоизлияниями.

Шерсть: шерсть для исследования отбирают из разных мест, не менее 5 образцов массой около 2 г каждый (лучше брать пучки загрязненной шерсти). Если шерсть упакована в кипы, берут не менее 10 образцов из разных мест каждой кипы, а также скопившуюся внутри обшивки пыль. Образцы от одной кипы объединяют и упаковывают вместе.

Кожа и кожсырье: берут кусочки кожи размером 3х3 см с периферических незагнивших и незаплесневевших участков шкурки. При наличии на внутренней стороне шкурки кровоподтеков или инфильтратов пробы берут и в этих местах.

Почва: пробы почвы с мест вероятного обсеменения спорами возбудителя (мест вынужденного убоя скота, стоянок и водопоя животных) берут на глубине до 15 см, на территории скотомогильников – на глубине до 2 м с помощью почвенных буров. При этом при заборе проб с большой территории обследуемую площадь разбивают на квадратные участки со стороной не более 4 м. В каждом квадрате намечают 5 точек по диагонали или 4 точки по краям и одну посередине, откуда производят отбор проб почвенным буром. Перед взятием почвы на территории скотомогильника верхний ее слой снимают на 2-3 см и пробы берут на глубину до 1,5-2,0 м через каждые 25 см не менее 200 г в пробе. Особое внимание обращают на костные и другие животные остатки, которые также отбираются для исследования. Пробы упаковываются в том же порядке. Каждую пробу весом около 100-200 г помещают в мешочек из плотной ткани с завязками или

в лабораторную посуду (широкогорлый флакон, банку), закрытую такой же тканью. Нельзя помещать пробы почвы в полиэтиленовые мешочки или в плотно закрытую посуду, так как в этих условиях происходит бурное развитие актиномицетов, губительно действующих на возбудитель сибирской язвы. Вынутую из глубины и не использованную для проб почву с целью обеззараживания смешивают с сухой хлорной известью, содержащей 25% активного хлора, в соотношении 1 часть хлорной извести на 3 части почвы, слегка увлажняют и сбрасывают в шурф. Место отбора проб дезинфицируют раствором хлорной извести, содержащей 5% активного хлора, инструменты – огнем паяльной лампы.

Вода: пробы воды из естественных и искусственных водоемов берут у поверхности (на глубине 10-15 см) и у дна при помощи батометра или специально приспособленной бутылки. Объем каждой пробы не менее 0,5 л, общий объем не менее 1 л. Кроме того, берут пробы придонного осадка у береговой кромки, которые исследуют так же как пробы почвы.

Смывы с объектов внешней среды: смывы делают с мест наиболее вероятного обсеменения спорами возбудителя с помощью стерильного тампона, смоченного стерильной дистиллированной водой. Площадь смыва одним тампоном около 100 см. Затем тампоны помещают в пробирки, заливают стерильной дистиллированной водой (15 мл) и закрывают пробкой.

Корма: концентрированные корма (зерно, отруби, комбикорм) отбирают в зависимости от условий хранения. При наличии незатаренных кормов первичные пробы отбирают из расчета 1 проба (не менее 400 г) на 4 м поверхности, но не менее 5 проб от каждого закрома, партии. Первичные пробы берут как из поверхностных, так и из глубоких слоев корма равномерно по всей площади. При наличии затаренных кормов отбор проводят от каждой упаковочной единицы. Отбор проб проводят сухим стерильным пробным шупом. После взятия проб от каждого объекта (партии) шуп очищают и обжигают огнем паяльной лампы. Пробы грубых кормов (сено, солома) берут из разных мест скирды при помощи ножниц и пинцета из расчета 1 проба (40 г) на 4 м площади скирды. Зеленую массу отбирают, как грубые корма. Корнеплоды, в зависимости от величины, отбирают из расчета 1-3 штуки на 4 м площади бурта, отсека. С отобранных корнеплодов скальпелем в местах, где имеются остатки земли, срезают

поверхностный слой, который используют для исследования.

В лабораторию направляют среднюю пробу, которую составляют из хорошо перемешанных первичных проб данной партии, емкости и т.п. Масса средней пробы должна быть не менее 500 г.

Воздух: пробы воздуха отбирают с помощью специальных приборов, снаряженных сорбирующей жидкостью или фильтрами. Объем исследуемого воздуха должен составлять не менее 3-5 м<sup>3</sup>.

### **Порядок проведения исследования**

При исследовании методом ПЦР материала, в котором предполагается наличие возбудителя сибирской язвы в виде спор, проводится их предварительная герминация с целью последующего обеззараживания и выделения ДНК.

Для анализа проб кожи, шкуры и шерсти добавляется реакция преципитации и исключается бактериоскопия и МФА.

Подготовленные для исследования пробы делятся на две части, одну из которых прогревают при 80 °С в течение 20 мин. Из непрогретой и прогретой частей материала проводят ПЦР-анализ. Исследование образцов из объектов окружающей среды осуществляют аналогично без использования реакции преципитации.

Загнивший патологический материал исследуют с помощью реакции преципитации и ПЦР.

**Обеззараживание проб для исследования методом ПЦР.** Для обеззараживания материала, содержащего спорообразующие микроорганизмы, в том числе *B. anthracis*, применяют методический подход, заключающийся в герминации спор, последующей обработке пенициллином, прогреванием и воздействии лизирующего буфера с гуанидинтиоцианатом. Принцип метода состоит в прорастании спор в вегетативные клетки при культивировании их в благоприятных условиях. Далее под действием температуры и пенициллина происходит разрушение клеточной мембраны бактерий с высвобождением ДНК. Последовательность выполнения операций следующая:

1-й этап. Для герминации спор исследуемый материал засевают в количестве 0,1 мл в пробирки с 0,9 мл бульона Хоттингера рН 7,6 и инкубируют с встряхиванием при температуре 37±1 °С в течение 2,5 ч.

2-й этап. В пробирки с материалом добавляют раствор бензилпенициллина в расчете 1000 ЕД/мл, инкубируют при 37±1 °С в течение 15 мин, затем прогревают в твердотельном термостате или на водяной бане при температуре 100±1 °С в течение 10 мин.

3-й этап. Из проб отбирают по 100 мкл материала в микроцентрифужные пробирки типа Эппендорф, добавляют по 300 мкл лизирующего буфера с гуанидинтиоцианатом и прогревают при температуре 65 °С в течение 15 мин.

После выполнения процедур 1–3 этапов материал для исследования считается обеззараженным.

**Для выделения ДНК** из обеззараженного материала используют, например, набор реагентов для выявления ДНК вегетативных и споровых форм *B. anthracis* в биологическом материале и объектах окружающей среды, а также для определения плазмидного состава *B. anthracis* путем выявления гена *ragA* (плазмида рХО1) и гена *capA* (плазмида рХО2) методом ПЦР-РВ – АмплиСенс® *Bacillus anthracis*-FRT (выпускает ФБУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора). Набор реагентов состоит из 2 комплектов реагентов: «ДНК-сорб-В» вариант 50 – комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала; «ПЦР-комплект» вариант FRT – комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК *Bacillus anthracis* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» (рисунок 5).

Во время экстракции ДНК дополнительно могут использоваться контрольные образцы (ОКО, ВКО, ПКО), в случае, если они входят в состав применяемой ПЦР тест-системы.



Рисунок 5. Набор реагентов АмплиСенс® *Bacillus anthracis*-FRT

Выделение ДНК проводится в помещении для обработки исследуемого материала с комплектом реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 50.

Допускается хранение очищенной ДНК в течение 7 сут при температуре от 2 до 8 °С и в течение года при температуре не выше минус 16 °С.

**Постановка ПЦР и детекция продуктов амплификации в режиме «реального времени».** Подготовка к амплификации проводится в ПЦР-боксе с использованием набора реагентов «АмплиСенс® *Bacillus anthracis*-FRT» для выявления ДНК *Bacillus anthracis*. Общий объем реакции – 25 мкл, объем ДНК-пробы – 10 мкл. Постановку ПЦР осуществляют согласно инструкции производителя.

**Учет и оценка результатов.** Результаты интерпретируют на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (рисунок 7), что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла «Сt» в соответствующей графе в таблице результатов (таблица 9).

**Таблица 9**

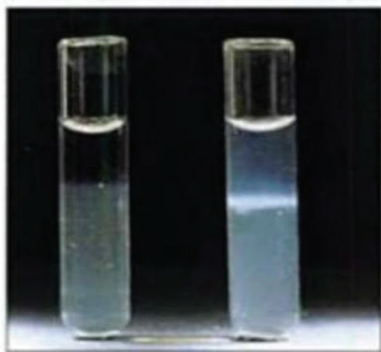
**Интерпретация результатов ПЦР с использованием тест-системы для обнаружения ДНК сибиреязвенного микроба в режиме «реального времени»**

Значение Сt по каналу			Результат анализа
FAM/Green (ген pagA плазмиды pXO1)	JOE/Yellow (ген capA плазмиды pXO2)	ROX/Orange (ВКО STI-704)	
Нет	Нет	≤ 31	<i>Bacillus anthracis</i> не обнаружена
< 33	Нет	≤ 31 (или нет)	<i>Bacillus anthracis</i> (pXO1+/pXO2-)
< 33	< 33	≤ 31 (или нет)	<i>Bacillus anthracis</i> (pXO1+/pXO2+)
Нет	<33	≤ 31 (или нет)	<i>Bacillus anthracis</i> (pXO1-/pXO2+)
Нет	Нет	Нет (или > 31)	Проба подлежит повторному анализу с этапа выделения ДНК

**Реакция преципитации по Асколи.** Реакция позволяет в короткие сроки обнаружить сибиреязвенный антиген в экстрактах из струпьев язв больных, органов умерших от сибирской язвы людей, шкур и органов павших животных. Исследованию в реакции Асколи подвергают в том числе и загнивший биоматериал. Для постановки реакции необходимы: преципитирующая сибиреязвенная сыворотка, экстракт из исследуемого материала и сибиреязвенный бактериальный антиген для контроля (Набор компонентов для диагностики сибирской язвы в реакции преципитации ПРЕЦИПАНТР®, производство ФКП «Орловская биофабрика»).

Экстрагирование проводят горячим или холодным способами. При этом следует учитывать, что в экстрактах, полученных горячим способом, меньше преципитинов.

Для получения экстракта из патологического материала и струпьев горячим способом материал измельчают, заливают 0,9 %-м раствором натрия хлорида с 0,3 %-м раствором карболовой кислоты в соотношении 1:10 и кипятят в течение 30-40 мин, при холодном способе – оставляют для экстрагирования на 16-18 ч при комнатной температуре. Полученные экстракты фильтруют до полной прозрачности через фильтровальную бумагу или вату, предварительно смоченные 0,9 %-м раствором хлорида натрия. В узкие пробирки наливают 0,2-0,3 мл прозрачной сибиреязвенной преципитирующей сыворотки, а затем пастеровской пипеткой осторожно наслаивают на нее такое же количество полученного экстракта. Если реакция положительная, то на границе соприкосновения жидкостей не позднее 15 мин появляется мутно-белое кольцо. Реакция оценивается знаком (+). При сомнительной реакции появление кольца наблюдается позднее 15 мин ( $\pm$ ). Если кольцо отсутствует, то реакция оценивается как отрицательная (-). Одновременно необходимо ставить три контрольных пробы: преципитирующая сыворотка плюс коммерческий стандартный сибиреязвенный антиген; преципитирующая сыворотка плюс экстрагирующая жидкость; нормальная лошадиная сыворотка плюс коммерческий стандартный сибиреязвенный антиген. Все контроли, кроме первого, должны быть отрицательными (рисунки 6).



отрицательная      положительная

Рисунок 6. Учет реакции преципитации по Асколи

Исследование кожевенного и мехового сырья на сибирскую язву в реакции преципитации по Асколи проводят в соответствии с «Наставлением по исследованию кожевенного и мехового сырья реакцией преципитации», утвержденным Главным управлением ветеринарии Минсельхоза СССР 25 мая 1971 г. Необходимо учитывать, что применяемые в настоящее время различные виды кислот и щелочей для выделения кожевенного сырья могут влиять на результаты реакции преципитации. Оптимальное значение рН экстрактов должно находиться в пределах 6,0-8,0. Кроме того, данный метод характеризуется недостаточно высокой чувствительностью, так как нередко дает отрицательный результат при исследовании заведомо сибиреязвенного материала.

Реакцию Асколи используют как экспресс-метод для обнаружения специфических сибиреязвенных антигенов у исследуемых культур. Для этого в 0,25-0,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида ресуспендируют петлю суточной агаровой культуры. Экстрагирование проводят горячим методом, а постановку реакции выше описанным способом. Учет результатов реакции проводят в течение 3 мин.

**ИХА.** Набор реагентов «Иммунохроматографическая тест-система для экспресс-выявления и идентификации спор возбудителя сибирской язвы» (выпускает ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора) предназначен для иммунохроматографического экспресс-выявления и идентификации спор возбудителя сибирской язвы.

Специфической мишенью, наличие которой в пробе выявляет данный тест, является спорный антиген *B. anthracis* (рисунок 7).



Рисунок 7. «ИХ тест-система *B. anthracis*»

ИХ тест-система обеспечивает выявление и идентификацию спор *B. anthracis* в суспензиях, полученных из колоний микроорганизмов, выращенных на агаре; суспензиях, полученных из объектов внешней среды путем специальной пробоподготовки.

**Проведение анализа:** за 15 мин до начала исследования достают ИХ-элемент из холодильника и выдерживают при комнатной температуре. Далее его извлекают из упаковки, помещают в чашку Петри (поверхность должна быть горизонтальной), с помощью пипетки наносят в приемное окно теста 0,1 мл подготовленного для испытания материала. После 3-х минутной экспозиции вносят 0,1 мл ФБР в приемное окно теста.

Учет результата – через 15-20 минут, интерпретация результатов – в таблице 10.

Таблица 10

**Интерпретация результатов «ИХ тест-система *B. anthracis*»**

Положительный результат	Наличие видимых глазом красных линий в зоне «С» и «Т»
Отрицательный результат	Наличие красной линии только в зоне «С»
Тест не работает	Отсутствие красной линии в зоне «С» даже при наличии красной линии в зоне «Т»
Тест не работает	Отсутствие красной линии в зоне «С» и в зоне «Т»

**РНГА.** Для выявления и идентификации споровых и вегетативных форм возбудителя в материалах от больных людей и животных,

объектах внешней среды и культурах применяется диагностикум эритроцитарный сибирезвенный иммуноглобулиновый. Методика постановки РНГА описана выше.

## СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ИНДИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУЛЯРЕМИИ

Туляремия является острым инфекционным природно-очаговым заболеванием с поражением лимфатических узлов, паренхиматозных органов, кожных покровов, иногда глаз, зева, легких и сопровождается выраженной интоксикацией. Согласно СанПиН 3.3686-21 возбудитель туляремии относится к микроорганизмам II группы патогенности.

Обнаружение возбудителя туляремии на I этапе исследования по схеме специфической индикации осуществляется при помощи методов – МФА, ИФА, РНГА (РНГАТ), ИХА, ПЦР и MALDI-TOF. Как равноценный методу РНГА, при отсутствии антительного эритроцитарного диагностикума, следует использовать антительный туляремиальный диагностикум на латексе в реакции РАО. Чувствительность методов МФА, РНГА, РАО, ИФА, ИХА при туляремии составляет от  $1 \times 10^5$  м.к. в мл и выше, при использовании ПЦР –  $1 \times 10^3$ - $1 \times 10^4$  м.к./мл.

**Световая микроскопия.** Возбудитель туляремии - грамотрицательные мелкие кокковидные бактерии диаметром 0,3-0,5 мкм. В мазках, приготовленных из культуры с жидких питательных сред, туляремиальный микроб имеет форму коротких палочек. При длительном выращивании на питательных средах туляремиальные бактерии проявляют значительный полиморфизм: встречается как более крупные, шарообразные до 3 мкм в диаметре клетки, так и мельчайшие до 0,1–0,2 мкм. В мазках-отпечатках из органов возбудитель окрашивается по Романовскому-Гимзе в фиолетовый цвет.

**Окраска мазков-отпечатков по Романовскому-Гимзе.** Из-за малых размеров туляремиальный микроб может быть обнаружен в окрашенных мазках-отпечатках только из обильно обсемененного патологического материала. Положительные результаты получают при содержании в 1 грамме ткани более 1 млрд микробов, поэтому бактериоскопия эффективна при исследовании павших диких или биопробных животных, но не эффективна при исследовании убитых на ранних стадиях заболевания зверьков. Этот метод не используется

при исследовании воды, смывов с объектов внешней среды, где концентрация возбудителя может быть незначительной.

Для ускоренной окраски мазков применяют способ, основанный на одновременной фиксации и окраске мазков. На мазок наносят 20 капель краски Романовского-Гимзы, смешанной в равных частях с метиловым спиртом или химически чистым ацетоном. Через одну минуту к краске приливают 10 мл подщелоченной дистиллированной воды (рН 7,2). Осторожным покачиванием краску смешивают с водой. Через 10-15 мин краску сливают, мазок промывают водопроводной водой, высушивают и микроскопируют.

В правильно окрашенном мазке бактерии туляремии имеют темно-фиолетовый цвет и легко определяются по размерам, форме, скопленному расположению и четко дифференцируются от светло-сиреневого окружающего фона.

Количество бактерий, обнаруженных в мазках-отпечатках из органов и крови, учитывают по 4-балльной шкале. Для диагностики достоверным считается обнаружение туляремийных бактерий в виде крупных, средних и небольших по величине скоплений в каждом поле зрения, оцененных в три или четыре балла.

**МФА.** Люминесцентная микроскопия является эффективным методом обнаружения возбудителя туляремии, позволяющим выявлять как живые, так и неживые туляремийные бактерии при концентрации  $10^6$  м.к./мл суспензии. При меньших концентрациях возбудитель также может быть обнаружен, но его выявление не носит закономерного характера. МФА позволяет обнаружить туляремийные бактерии при отрицательном результате световой бактериоскопии. Объектами исследования служат бактериальные взвеси, отпечатки органов и тканей животных, гомогенаты органов животных и беспозвоночных переносчиков. Метод используют для выявления возбудителя в органах павших и убитых биопробных животных, в трупах диких животных, органах отловленных диких животных. Метод прост в постановке, экспрессен (1,5-2,0 часа) и рекомендуется для ускоренного выявления и идентификации возбудителя туляремии.

Постановку МФА и учет результатов проводят по описанной в общем разделе процедуре прямым методом с контрастированием альбумином, меченым родамином, используя набор реагентов «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие туляремийные сухие» производства Филиал «Медгамал» ФГБУ «НИИЭМ» им. Н.Ф.

Гамалеи», Минздрав России (№ ФСР 2010/08923).

**ПЦР.** Для постановки реакции используются следующие тест-системы: «Ген – *Francisella tularensis*-РГФ», «Ген – *Francisella tularensis*- РЭФ», разработанные в ФКУН РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора (таблица 11).

**Таблица 11**

**ПЦР-тест системы с различным учетом результатов реакции**

ПЦР-тест-система		
С электрофоретическим учетом результатов		
Набор реагентов для выявления ДНК <i>F. tularensis</i> методом полимеразной цепной реакции с электрофоретическим учетом результатов (Ген <i>F. tularensis</i> – РЭФ)	№ ФСР 2011/12108	ФКУН РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора
С учетом результатов в режиме реального времени		
Набор реагентов для выявления ДНК <i>F. tularensis</i> методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени (Ген <i>F. tularensis</i> – РГФ)	№ ФСР 2011/12107	ФКУН РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора

Данные тест-системы предназначены для выявления возбудителя *F. tularensis* в клиническом материале и объектах внешней среды при помощи системы праймеров, комплементарных участку гена, кодирующего белок молекулярной массой 23 kD.

**Исследование материала для выявления ДНК возбудителя туляремии.** Исследование состоит из трех последовательных этапов:

- отбор и обеззараживание проб;
- приготовление реакционной ПЦР смеси для постановки реакции;
- детекция продуктов амплификации методом электрофореза, учет и оценка результатов.

Материалом для исследования могут быть пробы от больного (пунктат из бубона, соскоб из зева, отделяемое из глаза и др.), пробы из окружающей среды (вода, смывы, суспензии органов грызунов, кровь, кровососущие членистоногие и др.), бактериальные культуры.

Забор материала на исследование от человека и объектов окружающей среды, условия хранения и перевозки предварительно обрабо-

танных проб, а также порядок обработки и обеззараживания исследуемого материала, содержащего (подозрительного на содержание) микроорганизмы I-IV групп патогенности, при проведении работ с использованием амплификационных технологий осуществляют в соответствии с МУ 1.3.2569-09 (см. Приложение 1 и Приложение 2).

Кусочки органов массой до 10 г растирают в стерильной ступке со стеклянным порошком, после чего добавляют 0,9 % раствор натрия хлорида в соотношении 1:5 (вес/объем). Надосадочную жидкость отбирают с помощью пипетки через ватный тампон в отдельную пробирку. Центрифугируют в течение 15 мин при 12 000 об/мин, осадок суспендируют в физиологическом растворе и используют для выделения ДНК. Подготовку гидробионтов осуществляют аналогичным образом.

Пробы погадок хищных птиц и помета хищных млекопитающих суспендируют в физиологическом растворе из расчета 1:9 (1 часть пробы + 9 частей физиологического раствора). Для исследования отбирают 1 мл суспензии и переносят в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл. Пробирки центрифугируют при 5000 об/мин в течение 5 мин. Отдельным наконечником с аэрозольным барьером из каждой пробирки отбирают надосадочную жидкость и переносят в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл. Затем центрифугируют при 12 000 об/мин в течение 15 мин, надосадочную жидкость удаляют. Осадок ресуспендируют в 0,1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и используют для исследования.

Приготовление реакционной ПЦР смеси для постановки реакции осуществляют в соответствии с инструкцией производителя.

**Детекция продуктов амплификации методом электрофореза, учет и оценка результатов.** Окрашенный бромистым этидием гель просматривают под ультрафиолетовым излучением, для чего используют трансиллюминатор с максимальной длиной волны 254 нм. Анализируемые фрагменты проявляются в виде светящихся розово-красных полос.

При оценке результатов в отрицательном контроле полосы должны отсутствовать, в положительном контроле выявляется полоса фрагмента размером 548 н.п., в анализируемых пробах отсутствие полосы строго на уровне положительного контроля свидетельствует об отрицательном ответе, а наличие полосы, соответствующей по электрофоретической подвижности положительному контролю, свидетельствует о наличии в пробе ДНК *F.tularensis*.

*Иммуносерологические методы исследования.* Возможность исследу-

дования материала, не пригодного для бактериологического исследования, делает серологические методы в ряде случаев основным методическим приемом, позволяющим выявить туляремийные эпизоотии.

Все найденные трупы грызунов подлежат обязательному серологическому исследованию на наличие туляремийного антигена. Серологические методы особенно эффективны при поисках антигена в погадках хищных птиц (ПХП), пометах хищных птиц (ПХМ), субстратах гнезд и других объектах внешней среды.

При исследовании трупов диких или лабораторных животных готовят суспензию из кусочков органов животных (селезенка, печень) путем растирания их в ступке с добавлением 0,9 %-го раствора натрия хлорида из расчета 1:5 или 1:10. Полученную суспензию обеззараживают в соответствии с СанПин 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», фильтруют (лучше через асбестовую вату) для получения относительно прозрачного фильтрата. Можно использовать остатки суспензии из органов, приготовленных для постановки биологической пробы.

Для исследования субстрата гнезда грызунов желательно брать его целиком вместе с прилегающими слоями почвы. Материал заливают 0,9 % раствором натрия хлорида с избытком (примерно 10 мл). Через 1-6 ч надосадочную жидкость отсасывают, обеззараживают в соответствии с СанПин 3.3686-21, фильтруют и используют в серологических реакциях.

Наиболее эффективной и специфичной серологической реакцией для выявления туляремийного антигена при исследовании органов животных, ПХП, ПХМ, субстрата гнезд, почвы и тому подобного является реакция нейтрализации антител (РНАТ) с туляремийным антигенным эритроцитарным диагностикумом. При массовых исследованиях ПХП, ПХМ, других объектов внешней среды за диагностический титр принимают разведение фильтрата 1:20 и выше. Реакции в более низких титрах расценивают как сомнительные. При исследовании некоторых объектов (бактериальные суспензии, органы животных и др.) помимо РНАТ можно применять иммуноферментный анализ (ИФА), реакцию объемной агломерации (РОА), реакцию агглютинации латекса (РАЛ) и некоторые другие методы, с успехом используемые в отдельных регионах и учреждениях.

ИФА используется не только для выявления туляремийного антигена в биологических объектах (органах животных, ПХП, ПХМ, объектах внеш-

ней среды), но и для идентификации выделенных культур возбудителя туляремии. С помощью ИФА возможно обнаружение  $5 \times 10^4$ – $1 \times 10^5$  м.к./мл туляремиальных бактерий или 1-5 нг/мл туляремиального антигена.

Для постановки ИФА используют диагностические иммуноферментные тест-системы для определения туляремиального антигена (методика описана выше в методической части учебного пособия) производства ФКУН РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, ФКУЗ Ставропольский НИПЧИ Роспотребнадзора (таблица 12).

**Таблица 12**

**Тест-системы диагностические иммуноферментные**

Для выявления антигенов		
Тест-система дот-иммуноферментная для детекции туляремиального микроба моноклональная (ДИАТул-М)	№ ФСР 2012/13944	ФКУН РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора
Набор реагентов «Тест-система диагностическая для выявления возбудителя туляремии в иммуноферментном анализе (ИФА)», «ИФА-Тул-СтавНИПЧИ»	№ ФСР 2010/06744	ФКУЗ «Ставропольский НИПЧИ Роспотребнадзора»

**ИХА.** «ИХ тест *F. tularensis*» предназначен для экспресс-выявления и идентификации микробных клеток *Francisella tularensis* при проведении лабораторных исследований объектов окружающей среды.

Специфической мишенью, наличие которой в пробе выявляет данный тест, является липополисахарид *F. tularensis* (рисунок 8).



Рисунок 8. «ИХ тест-система *F. tularensis*»

«ИХ тест-система *F. tularensis*» обеспечивает выявление и иденти-

фикацию микробных клеток *F. tularensis* в суспензиях, полученных из колоний микроорганизмов, выращенных на среде FT-АГАР (ТУ 9398-028-78095326-2007) или среде с черным альбумином, или гемоглобином; в суспензиях, полученных из объектов внешней среды путем специальной пробоподготовки.

«ИХ тест-система *F. tularensis*» обеспечивает видоспецифическое выявление микробных клеток *F. tularensis* в концентрации 10 м.к./мл.

Для идентификации микробных клеток *F.tularensis* готовят микробную взвесь, для этого микробиологической петлей берут колонию с поверхности плотной питательной среды и суспендируют в ФБР по стандартному образцу мутности до  $1 \times 10^9$  м.к./мл, прогревают на водяной бане при 56 °С в течение 30 минут, разводят в ФБР до концентрации  $1 \times 10^7$  м.к./мл (таблица 13).

Анализ проводят в трех повторах. С помощью пипетки наносят в приемное окно теста 0,1 мл подготовленного для испытаний материала. Учет результата проводят через 15-20 минут.

**Таблица 13**

**Интерпретация результатов «ИХ тест-системы *F. tularensis*»**

Положительный результат	Наличие видимых глазом красных линий в зоне «С» и «Т»
Отрицательный результат	Наличие красной линии только в зоне «С»
Тест не работает	Отсутствие красной линии в зоне «С» даже при наличии красной линии в зоне «Т»
Тест не работает	Отсутствие красной линии в зоне «С» и в зоне «Т»

**РНГА.** Методика постановки РНГА описана выше в методической части учебного пособия. В реакциях используется «Диагностикум эритроцитарный туляреминый иммуноглобулиновый» производства ФКУЗ Ставропольский НИПЧИ Роспотребнадзора, либо производства КНЦКиЗИ г. Алматы, Казахстан.

**РНАТ.** Суспензию, содержащую искомый возбудитель, смешивают с равным объемом специфической иммунной сыворотки, содержащей известные АТ в количестве 2 СЕ (сывороточные единицы), инкубируют при 30 мин при 37 °С. После чего добавляют диагностикум эритроцитарный туляреминый антигенный (производства ФКУЗ Ставропольский НИПЧИ Роспотребнадзора или КНЦКиЗИ г. Алматы, Казахстан). Смесь встряхивают, оставляют при комнатной температуре на 2 часа.

Учет результатов: если в исследуемом материале имеется туляреминый АГ, он свяжет добавленные специфические АТ (нейтрализует их) и поэтому гемагглютинации с антигенным эритроцитарным диагностикумом не произойдет. При положительной реакции на дне луночки формируется диск (пуговка), при отрицательной – «зонтик».

**РАО** (*Реакция агломерации объемная*). Постановку РАО проводят по описанной выше методике с использованием экспериментально-производственных серий «Диагностикума иммуноглобулинового полимерного» производства ФКУЗ Ростовский-на-Дону НИПЧИ Роспотребнадзора. Чувствительность реакции –  $8 \times 10^5$  м.к./мл возбудителя туляремии.

## СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ИНДИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ БРУЦЕЛЛЕЗА

Бруцеллез – зоонозное заболевание, при котором основным источником инфекции для людей являются больные сельскохозяйственные животные. Заболевание людей преимущественно вызывают *B. melitensis*, *B. abortus* и *B. suis* биовары 1-4, реже *B. canis*, *B. suis* биовар 5, *B. neotomae*, *B. ceti* и *B. pinnipedialis*. Согласно СанПиН 3.3686-21 возбудитель бруцеллеза относится к микроорганизмам II группы патогенности.

Детекция возбудителя бруцеллеза в нативном материале на I этапе исследования осуществляется в соответствии со схемой специфической индикации при помощи экспрессных методов ПЦР, МФА, ИФА, РНГА (при наличии эритроцитарных диагностикумов). Чувствительность этих методов на чистых культурах бруцелл колеблется в пределах  $1 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  м.к./мл, ПЦР –  $1 \times 10^3$  м.к./мл.

Бруцеллезная люминесцирующая сыворотка окрашивает все виды бруцелл, то есть не дифференцирует их друг от друга, в РНГА, ИФА и ПЦР также наблюдается положительная реакция со всеми видами *Brucella*. Для определения видовой принадлежности выделенных штаммов бруцелл используют ПЦР с видоспецифичными праймерами.

**Световая микроскопия.** *Brucella* – мелкая нежная палочка овоидной или слегка удлинённой формы. Морфологически клетки бруцелл, относящиеся к разным видам и биоварам, при световой микроскопии выглядят одинаково (при изучении в электронном микроскопе клетки *B. melitensis* в основном имеют кокковидную форму, а *B. abortus* и *B. suis* – палочковидную). Размер бруцелл кокковидной формы 0,3-0,6 мкм, палочковидной – 0,6-2,5 мкм. Расположение бруцелл в мазке беспорядочное, отмечается более или менее выраженный полиморфизм. При микроскопическом исследовании материала на бруцеллез

принято использовать два метода окраски – по Грамму и Козловско-му. При окраске по Граму клетки окрашиваются в розовый цвет (грам-отрицательные). Для окраски по методу Козловского необходимо на фиксированный препарат нанести 0,5 % водный раствор сафранина и подогреть до появления пузырьков, затем промыть водой и докрасить 0,5% водным раствором малахитовой или бриллиантовой зелени в течение 40-50 сек. При этом методе окраски бруцеллы окрашиваются в розовый цвет сафранином, а другие микроорганизмы – бриллиантовой зеленью в зеленый цвет.

**МФА.** Для проведения анализа используют набор реагентов «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие бруцеллезные сухие» (Филиал «Медгамал» ФГБУ «НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России) или «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие бруцеллезные сухие («РИФ-Бру-СтавНИПЧИ»)» (ФКУЗ Ставропольский НИПЧИ Роспотребнадзора).

Препараты предназначены для экспресс-индикации бруцеллеза прямым иммунофлуоресцентным методом с контрастированием неспецифического свечения альбумином, меченым родамином, в первичных посевах, загрязненных сопутствующей микрофлорой, в пробах молока, в патологическом материале от животных и людей.

При исследовании молока мазки готовят из проб цельного молока, из сливок и осадка – после предварительного центрифугирования при 3 тыс. об/мин в течение 1 ч. Приготовленные мазки обезжиривают эфиром в течение 20 мин.

При исследовании материала от абортированных плодов, различных экссудатов и органов инфицированных животных и людей готовят мазки-отпечатки, прикладывая предметное стекло к поверхности свежего среза (наличие на стекле кусочков органов и тканей недопустимо!). Из каждого объекта готовят не менее 3 мазков.

**ПЦР.** Для специфической индикации бактерий *Brucella* *ssp.* методом ПЦР разработаны следующие тест-системы с учетом результатов в режиме реального времени: «Набор реагентов для выявления ДНК бактерий *Brucella* *ssp.* в биологическом материале и культурах микроорганизмов методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией (АмплиСенс® *Brucella* *ssp.*-FL)» (выпускает ФБУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора); «Набор реагентов для выявления и идентификации ДНК возбудителей бруцеллеза методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОМ-Скрин-

Бруцеллез-РВ)» (изготовитель ООО «Синтол»); «Набор реагентов для выявления и идентификации ДНК возбудителей бруцеллеза, сапа и мелиоидоза методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОМ-Скрин-Бру/Сап/Мелиоидоз-РВ)» (изготовитель ООО «Синтол»).

Забор материала на исследование от человека и объектов окружающей среды, условия хранения и перевозки предварительно обработанных проб, а также порядок обработки и обеззараживания исследуемого материала, содержащего (подозрительного на содержание) микроорганизмы I-IV групп патогенности, при проведении работ с использованием амплификационных технологий осуществляют в соответствии с МУ 1.3.2569-09 (см. Приложение 1 и Приложение 2).

ПЦР-анализ с электрофоретическим учетом результатов проводят с помощью наборов «Тест-система для выявления ДНК *Brucella* spp. методом полимеразной цепной реакции (ГенБру)» (выпускает ФКУН РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора); «ПЦР-тест-система для выявления ДНК *Brucella melitensis* (Bru)» (производство ООО «Лаборатория Изоген»).

Назначение: Набор реагентов «АмплиСенс® *Brucella* spp.-FL» предназначен для выявления ДНК бактерий *Brucella* spp. (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae*) в биологическом материале и культурах микроорганизмов методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией.

*Вариант FER.* *Формы комплектации 1 и 2 предназначены для полного анализа, включая выделение ДНК из клинического материала и проведение ПЦР-амплификации ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией по «конечной точке». Формы комплектации 3 и 4 предназначены для проведения ПЦР-амплификации ДНК. Для полного анализа необходимо дополнительно использовать комплект реагентов «ДНК-сорб-В» для выделения ДНК из клинического материала (ТУ 9398-003-01897593-2006) производства ФБУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора.*

*Вариант FRT.* *Форма комплектации 1 предназначена для полного анализа, включая выделение ДНК из клинического материала и проведение ПЦР-амплификации ДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».*

*Форма комплектации 2 предназначена для проведения ПЦР-амплификации ДНК. Для полного анализа необходимо дополнительно использовать комплект реагентов «ДНК-сорб-В» для выделения ДНК из клинического материала производства ФБУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора.*

Набор реагентов для выявления и идентификации ДНК возбудителей бруцеллеза методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОМ-Скрин-Бруцеллез-РВ) по ТУ 9398-015-46395995-2013 (изготовитель ООО «Синтол»).

Набор реагентов «ОМ-Скрин-Бруцеллез-РВ» предназначен для качественного определения (скрининг, мониторинг) ДНК возбудителей бруцеллеза (*Brucella spp.*) в биологическом материале: в крови, сыворотке, пунктатах лимфатических узлов, синовиальной жидкости, костном мозге, моче, желчи; материале животных (околоплодные воды, плацента, выделения из половых и родовых путей); молоке, мясе и других пищевых продуктах животного происхождения, в пробах из объектов окружающей среды: пробах почвы, воды, смывах с различных поверхностей, а также в культурах микроорганизмов методом ПЦР-РВ.

Диагностическая роль набора заключается в возможности его использования в поддержке диагностики специфической патологии (бруцеллез) при исследовании материала от больного (подозрительного на заболевание) и индикации патогенных биологических агентов (ПБА) в объектах окружающей среды; как ускоренного предварительного теста при выполнении биологического метода исследования и идентификации подозрительных культур; для эпидемиологического мониторинга.

**Тип исследуемых образцов.** Материалом для исследований служат препараты нуклеиновых кислот, выделенные из проб: кровь, сыворотка, пунктаты лимфатических узлов, синовиальная жидкость, костный мозг, моча, желчь, материал от животных (околоплодные воды, плацента, выделения из половых и родовых путей), молоко, мясо и другие пищевые продукты животного происхождения, а также в пробы из объектов окружающей среды – пробы почвы, воды, смывы с различных поверхностей и т.д.

При амплификации методом ПЦР-РВ всего в двух реакционных смесях используются 9 олигонуклеотидных праймеров, фланкирующих специфические фрагменты ДНК внутреннего положительного контроля ПЦР-РВ, а также семь флуоресцентных зондов. Процесс амплификации специфических фрагментов заключается в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройке полинуклеотидных цепей с этих праймеров ДНК-полимеразой с детекцией результатов в режиме реального времени. Постановка ПЦР-РВ осуществляется на специальных приборах, например,

«АНК-32 (32М, 48)» (ИАП РАН, г. Санкт-Петербург, Россия), «CFX-96» («BioRad», США), или эквивалентных по характеристикам.

Положительный результат теста означает, что исследуемый материал содержит ДНК бруцелл. Отрицательный результат теста означает, что исследуемый материал не содержит ДНК бруцелл.

**Ограничения метода.** В инфицированном материале ДНК возбудителей бруцеллеза может быть не обнаружена по причине ингибирования ПЦР-РВ и/или недостаточной эффективности выделения ДНК. Для достижения показателей аналитической чувствительности используемый набор для выделения должен обеспечивать эффективность выделения НК на уровне не менее 20%.

Причиной получения ложноположительного результата является контаминация на этапе выделения ДНК или на этапе проведения реакции ПЦР-РВ. Ложноположительный результат выявляется с помощью отрицательных контрольных образцов выделения и ПЦР-РВ.

Причиной получения ложноотрицательного результата является ингибирование ПЦР-РВ и/или недостаточная эффективность выделения ДНК. Ложноотрицательный результат выявляется с помощью внутреннего положительного контрольного образца и ПЦР-РВ.

Аналитические характеристики:

Чувствительность – не более  $1,0 \cdot 10^3$  копий ДНК в миллилитре пробы (копий·мл<sup>-1</sup>)

Специфичность – ложноположительные и ложноотрицательные результаты при анализе образцов НК музейных штаммов *Br.abortus*, *Br.suis*, *Br.melitensis*, *Br.ovis*, *Br.canis*, *Br.neotomae*, (14 заведомо положительных образцов), а также НК гетерологичных видов микроорганизмов (6 заведомо отрицательных образцов) отсутствовали.

Диагностическая чувствительность – не менее 99,0% с доверительной вероятностью 90%.

Диагностическая специфичность – при исследовании 52 отрицательных образцов, содержащих гетерологичные микроорганизмы (*F. tularensis*, *Y. pestis*, *Escherichia coli*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica*, *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia ihailandensis*, *Legionella pneumophila*, *Bacillus anthracis*, *Vibrio cholerae*, *Enterobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mitis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Morganella morganii*) в концентрации не менее  $1,0 \cdot 10^3$  м.к./мл. Диагностическая специфичность – не менее 96% с доверительной вероятностью 90%.

**Выделение ДНК.** Для выделения НК используют зарегистрированные наборы реагентов согласно происхождению проб. Полученный препарат НК используется для проведения анализа с помощью набора реагентов «ОМ-Скрин-Бруцеллез-РВ».

Для определения возможной контаминации на этапе выделения ДНК в каждую партию выделения наряду с исследуемым материалом включают отрицательный контроль выделения (ОКО-В), который анализируют далее в ПЦР-РВ.

Для определения эффективности выделения ДНК из исследуемого материала в каждую пробу на этапе ее подготовки к анализу добавляют внутренний положительный контроль выделения (ВПК-В) из состава набора реагентов «ОМ-Скрин-Бруцеллез-РВ».

Набор реагентов для выявления и идентификации ДНК возбудителей бруцеллеза, сапа и мелиоидоза методом полимеразной цепной реакции в реальном времени («ОМ-Скрин-Бру/Сап/Мелиоидоз-РВ») по ТУ 939816-017-46395995-2013 (изготовитель ООО «Синтол»)

*Предназначение и его диагностическая роль.* Для качественного определения (скрининг, мониторинг) ДНК возбудителей бруцеллеза, сапа и мелиоидоза, в биологическом материале (кровь, сыворотка крови, моча, экссудат из бурситов, грудное молоко, желчь, мокрота, выделения из носа, отделяемое язв, испражнения, рвотные массы, содержимое абсцессов, пунктаты из лимфатических узлов, костный мозг, спинномозговая и синовиальная жидкости, секционный материал), а также в материале от животных (кусочки органов трупов животных, селезенка, печень, легкое, а также лимфатических узлов, кровь, костный мозг и т.д.), пищевых продуктах животного происхождения (мясе, молоке и т.д., объектах окружающей среды (почва, трава, фураж, подстилка, вода и т.д.), а также в культурах микроорганизмов методом ПЦР-РВ.

Ген-Бру тест-система предназначена для выявления *Brucella spp.* в клиническом материале, органах животных и объектах внешней среды.

Для детекции *Brucella spp.* подобрана система, состоящая из двух пар праймеров. Праймеры *Bru31* и *Bru32* обеспечивают специфическую амплификацию фрагмента ДНК размером 299 п.н., праймеры *Bru3* и *Bru4* – специфическую амплификацию фрагмента ДНК размером 175 п.н. Тест-система выявляет в ПЦР  $1 \times 10^3$  м.к./мл *Brucella spp.*

Объектом для исследования может быть клинический материал, объекты внешней среды, органы животных, а также микробные взвеси при идентификации выделенных культур. При работе с клиниче-

ским материалом и загрязненными объектами внешней среды необходимо предварительный этап подготовки проб (выделение ДНК). Подготовку проб осуществляют с помощью поставляемого отдельно набора и прилагаемой к нему инструкции.

*Оценка результатов.* По окончании электрофореза агарозный гель извлекают из камеры и помещают на 10 мин в ванночку с раствором бромистого этидия в концентрации 0,5 мкг/мл для окрашивания ПЦР-продуктов. Результат проведения ПЦР регистрируют и документируют в проходящем ультрафиолете с использованием документирующей видеосистемы или зеркального фотоаппарата с пленкой типа «Микрат» 300. Результаты оценивают по наличию фрагментов ДНК, полосы которых располагаются на том же уровне в геле, что и полосы в положительном контроле с препаратом ДНК. Фрагмент ДНК *Brucella spp.* после второго этапа ПЦР имеет размер 175 н.п.

Отрицательный контроль – полоса на уровне положительного контроля должна отсутствовать; наличие полосы свидетельствует о контаминации компонентов тест-системы.

Наличие полос, располагающихся выше или ниже контрольной, является неспецифичным ответом и во внимание не принимается.

**ИФА.** Для постановки ИФА используют набор реагентов «Тест-система диагностическая для выявления возбудителя бруцеллеза в иммуноферментном анализе (ИФА) («ИФА-Бру-СтавНИПЧИ»)» (ФКУЗ Ставропольский НИПЧИ Роспотребнадзора) или «Набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G (или M) к возбудителю бруцеллеза «Бруцелла-IgG-ИФА-БЕСТ»/«Бру-целла-IgM-ИФА-БЕСТ» (ЗАО «ВЕКТОР-БЕСТ»).

В основу метода положена схема сэндвич-варианта иммуноферментного анализа.

Чувствительность набора относительно стандартной панели предприятия, включающей взвеси гомологичных штаммов в концентрации  $5,0 \times 10^6$  м.к./мл и выше, составляет 100 %.

Специфичность набора относительно стандартной панели предприятия, включающей взвеси гетерологичных штаммов в концентрации  $1,0 \times 10^8$  м.к./мл и выше, составляет 100 %.

#### **Подготовка исследуемого материала:**

Материал органов и тканей от подозрительных на зараженность бруцеллезом животных или абортированных плодов растирают в ступке, добавляя 10-кратный объем 0,9 % раствора натрия хлорида с

2 % раствором формалина, отбирают жидкую часть и прогревают ее на водяной бане при температуре  $100 \pm 1$  °С в течение 20 мин с последующим добавлением формалина до 2 % концентрации, выдерживают в течение 2 ч при температуре  $22 \pm 4$  °С. Надосадочную жидкость фильтруют через марлевый или бумажный фильтр.

Молоко исследуют в нативном виде (верхний слой).

Пробу брынзы (рассольных сыров) массой 10,0 г растирают в ступке с 50,0 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Верхний слой фильтруют через два слоя марли. Молоко и фильтрат брынзы инактивируют формалином до конечной концентрации 2 % и оставляют на 2 ч при температуре  $22 \pm 4$  °С.

**Постановка ИФА.** Постановку анализа осуществляют в лунках сенсibilизированного планшета согласно инструкции производителя. Набор реагентов для проведения ИФА производства Вектор-Бест не требует сенсibilизации планшета.

Регистрацию результатов проводят на регистрирующем устройстве типа Мультискан или на фотометре для ИФА при длине волны 492 нм. Длительность процедуры измерения оптической плотности не должна превышать 15 мин.

**Учет результатов реакции.** Положительными считают результаты, если оптическая плотность образцов в 2 и более раз превышает оптическую плотность отрицательного контроля.

*РНГА (при наличии эритроцитарных диагностикумов).* В настоящее время действующих сертифицированных препаратов, направленных на выявление бруцеллезных антигенов, нет.

РА. Сыворотку диагностическую поливалентную бруцеллезную сухую для реакции агглютинации выпускает ФКУЗ Иркутский НИПЧИ Роспотребнадзора.

## СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ИНДИКАЦИЯ ПБА НЕУСТАНОВЛЕННОГО СИСТЕМАТИЧЕСКОГО ПОЛОЖЕНИЯ

Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 31 мая 2018 г. утверждены Методические рекомендации МР 3.1.0129-18 «Порядок организации и проведения индикации патогенных биологических агентов, в том числе неустановленного систематического положения», предназначенные для специалистов органов и учреждений Роспотребнадзора, научных и медицинских организаций.

МР определяют основные принципы индикации и лабораторной диагностики инфекционных болезней с тяжелым клиническим течением и (или) неясной клинической картиной, возбудителями которых могут быть, в том числе, и микроорганизмы неустановленного систематического положения (новые, ранее не известные, атипичные), схему лабораторной диагностики, номенклатуру и объем исследований, требования биологической безопасности при проведении работ.

Установление этиологических факторов опасных инфекционных болезней бактериальной, вирусной, микотической и риккетсиозной природы, болезней с тяжелым клиническим течением и (или) неясной клинической картиной, возбудителями которых могут быть микроорганизмы неустановленного систематического положения, а также индикация ПБА в случае преднамеренного применения может осуществляться в лабораториях Центра индикации, Опорных баз Центра индикации и мобильных комплексов СПЭБ, деятельность которых определены приказом Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 01.12.2017 № 1116 «О совершенствовании системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации»; задачи и функции СПЭБ определены приказами Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 24.03.2015 № 231 «О деятельности специализированных противоэпидемических бригад, сформированных на базе противочумных институтов Роспотребнадзора», и от 22.11.2007 № 330 «О регламенте функционирования СПЭБ» с целью обеспечения готовности СПЭБ к работе в зонах ЧС различного характера. Для выявления и дифференциации этиологических факторов болезни используют подходы, изложенные в МУ 3.4.3008-12 «Порядок эпидемиологической и лабораторной диагностики особо опасных, «новых» и «возвращающихся» инфекционных болезней».

Наличие одной из известных инфекционных болезней можно заподозрить на основании проведения клинико-эпидемиологической диагностики. Если предварительный диагноз поставить не удастся, то проводится исследование материала на наличие ПБА неустановленного систематического положения. Поскольку в этом случае при проведении лабораторного исследования необходимо исключение всех известных на текущий момент возбудителей инфекционных

болезней, то используют синдромный подход, предложенный ВОЗ (Руководство по сбору клинических образцов во время полевых исследований вспышек. WHO/CDS/CSR/EDC/2000.4).

В случае выявления больного с наличием определенного набора клинических признаков (симптомов), можно предположить, что болезнь вызвана:

- патогенным биологическим агентом бактериальной, вирусной или риккетсиозной природы,
- токсинами бактериального, растительного и животного происхождения,
- химическими веществами,
- радиоактивными агентами.

Основными клиническими синдромами болезней являются: синдром острой диареи, синдром острой геморрагической лихорадки, острый желтушный синдром, острый неврологический синдром, острый респираторный синдром, острый дерматологический синдром, острый офтальмологический синдром, острый «системный» синдром.

Для каждого из вышеуказанных острых синдромов существует перечень инфекционных болезней различной этиологии, для которых данный синдром может являться ведущим, в то же время, многие инфекционные болезни имеют не одну, а несколько клинических форм, каждая из которых характеризуется определенным синдромом. Наличие у больного одного из вышеуказанных синдромов при отсутствии известных предрасполагающих факторов служит основанием для проведения лабораторного исследования с целью подтверждения или исключения, прежде всего, возбудителей известных инфекционных болезней, которые характеризуются данным синдромом.

## ПОРЯДОК ОРГАНИЗАЦИИ И ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТ В ЛАБОРАТОРИЯХ ЦЕНТРОВ ИНДИКАЦИИ И ДИАГНОСТИКИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ ПРИ ИНДИКАЦИИ ПБА НЕУСТАНОВЛЕННОГО СИСТЕМАТИЧЕСКОГО ПОЛОЖЕНИЯ

**Номенклатура и объем исследований.** Порядок проведения исследований определяется результатами клинико-эпидемиологической диагностики и регламентируется действующими нормативными документами. При отсутствии четкого клинико-эпидемиологического диагноза исследования проводят комплексно на наличие возбу-

телей известных инфекционных болезней с учетом ведущего синдрома.

При получении материала Центры индикации и диагностики возбудителей опасных инфекционных болезней в экстренном порядке обеспечивают передачу материала, предназначенного для вирусологических исследований, в Национальный Центр верификации диагностической деятельности возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов Роспотребнадзора (ГНЦ ВБ «Вектор»). Транспортировка материала осуществляется специалистами учреждения, на базе которого функционирует Центр индикации и диагностики возбудителей опасных инфекционных болезней.

***Основными принципами специфической индикации и лабораторной диагностики возбудителей неустановленного систематического положения являются:***

1. Использование единой комплексной схемы анализа, предусматривающей на первом этапе последовательное выявление или исключение маркеров:

- вирусов I-II группы патогенности;
- бактерий I-II групп патогенности;
- микроспоридий II группы патогенности;
- известных возбудителей инфекционных болезней, которые обуславливают определенный синдром.

На втором этапе – индикация и идентификация культур возбудителей неустановленного систематического положения.

2. Использование единых методов исследования.

3. Использование единой схемы передачи информации о результатах специфической индикации.

В основу единой схемы специфической индикации положен принцип двухэтапного исследования поступившего материала (нативного и после биологического накопления) с использованием методов экспресс-анализа, ускоренной диагностики. Биологическое накопление предусматривает посев исследуемого материала на питательные среды и заражение биопробных животных с искусственно сниженной резистентностью. Исследования с использованием биологического метода (заражение биопробных животных) проводят только после получения отрицательных результатов индикации вирусов I группы патогенности.

Для проведения лабораторных исследований используют диагностические препараты, зарегистрированные в установленном порядке,

при их отсутствии – коммерческие незарегистрированные препараты, экспериментальные производственные серии.

При детекции в исследуемом материале генетических и антигенных маркеров вирусов I группы патогенности (оспы, Эбола, Марбург, Ласса и др.) дальнейшую работу с материалом прекращают. Материал упаковывают и хранят до получения окончательных результатов исследования, осуществляемого в ГНЦ ВБ «Вектор».

При выявлении в материале генетических маркеров вирусов II группы патогенности (Рифт-Валли, ККГЛ, Денге, вируса желтой лихорадки и других флавивирусов, хантавирусов, вызывающих геморрагический синдром) аликвоты проб направляют (по согласованию) в Референс-центры по соответствующей нозологии.

Методами специфической индикации ПБА неустановленного систематического положения являются МФА, ПЦР, ИФА, РНГА, морфометрический, молекулярно-генетический, масс-спектрометрический и другие виды анализа.

Забор материала на исследование от человека и объектов окружающей среды, условия хранения и перевозки предварительно обработанных проб, а также порядок обработки и обеззараживания исследуемого материала, содержащего (подозрительного на содержание) микроорганизмы I-IV групп патогенности, при проведении работ с использованием амплификационных технологий осуществляют в соответствии с МУ 1.3.2569-09 (см. Приложение 1 и Приложение 2).

В зависимости от этапа и результатов исследования выдаваемые ответы могут быть предварительными и (или) окончательными (см. методическую часть).

Информация о результатах исследования передается в учреждение, направившее материал, в Управление Роспотребнадзора данной территории, Федеральную службу по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Требования биологической безопасности при проведении исследований приведены в общей части учебного пособия.

## ИНДИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ, ОБУСЛОВЛИВАЮЩИХ СИНДРОМ ОСТРОЙ ГЕМОМРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ

Причиной Болезни с синдромом острой геморрагической лихорадки, характеризующейся острым началом, наличием таких симптомов как геморрагическая или пурпурная сыпь, носовое кро-

вотечение, кровохарканье, наличие крови в стуле, при отсутствии известных предрасполагающих факторов, могут являться вирусы I-II группы патогенности: оспы, Эбола, Марбург, Ласса, другие аренавирусы, Рифт-Валли, ККГЛ, Денге, вирус желтой лихорадки и другие флавивирусы, хантавирусы, а также возбудители опасных бактериальных инфекционных болезней: *Y. pestis*, *B. anthracis*, *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei*, *Leptospira* spp.

Материалом для исследования при синдроме острой геморрагической лихорадки являются кровь, смывы из носоглотки, содержимое везикул, пустул, язв, СМЖ, моча и секционный материал (головной мозг, мозговые оболочки, паренхиматозные органы).

**Световая микроскопия.** Микроскопия мазков и мазков-отпечатков с использованием окраски по Граму и Романовскому-Гимзе (возбудители бактериальной природы), Ребигеру (визуализация капсулы возбудителя сибирской язвы).

**МФА** используют при индикации возбудителей чумы, сибирской язвы, сапа, мелиоидоза в исследуемом материале и после «подращивания» на средах обогащения, а также вируса оспы и флавивирусов. Приготовление, окрашивание специфическими иммуноглобулинами, просмотр мазков и оценку результатов осуществляют в соответствии с инструкцией по применению препарата. НМФА используют и для обнаружения антител к возбудителям ГЛПС, КГЛ, флавивирусных инфекций.

При обнаружении специфического свечения в препаратах выдают предварительный положительный ответ.

**ПЦР** используют для индикации вирусов Эбола, Марбург, Ласса и других аренавирусов, Рифт-Валли, ККГЛ, Денге, вируса желтой лихорадки и других флавивирусов, хантавирусов, возбудителей чумы, сибирской язвы, сапа, мелиоидоза. Исследования проводят в соответствии с требованиями действующих нормативно-методических документов и инструкций по применению препаратов по следующей схеме:

- выделение ДНК/РНК
- проведение ОТ-ПЦР с семейство- и/или родо-, видоспецифичными праймерами для выявления вирусов I-II группы патогенности
- постановка ПЦР для выявления ДНК возбудителей чумы, сибирской язвы, сапа, мелиоидоза.

**ИФА и другие иммуносерологические реакции.** Сыворотку крови исследуют с целью выявления специфических антител классов М и G

и/или антигенов к вирусу оспы, вирусам II группы патогенности и возбудителям чумы, сибирской язвы, сапа, мелиоидоза, лептоспироза.

Идентификацию культур *Y. pestis*, *B. anthracis*, *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei* осуществляют в соответствии требованиями нормативно-методических документов, регламентирующих лабораторную диагностику указанных микроорганизмов, а также с использованием методов молекулярно-генетического, масс-спектрометрического и др. анализов.

При получении отрицательных результатов о наличии в исследуемом материале вышеуказанных возбудителей особо опасных инфекционных болезней, исследования продолжают до выявления других возбудителей, обуславливающих данный синдром, с использованием всего спектра средств диагностики:

- идентификация биохимической активности микроорганизмов с использованием автоматизированных микробиологических анализаторов, экспертных систем и баз данных;

- идентификация микроорганизмов методом MALDI-TOF (матричная лазерная пролетная масс-спектрометрия) с последующим анализом спектра с помощью известных баз данных;

- идентификация микроорганизмов на основании геометрических размеров и поверхности клеток методами атомно-силовой микроскопии (АСМ);

- идентификация микроорганизмов на основании определения нуклеотидной последовательности фрагмента или полной последовательности гена 16S рРНК или других генов жизнеобеспечения бактерий, D2 региона гена 28S рРНК грибов с последующим анализом с помощью известных баз данных.

- идентификация микроорганизмов на основании определения риботипа с последующим анализом с помощью известных баз данных.

По результатам идентификации составляют паспорт штамма, с указанием всех полученных характеристик. Передачу выделенных штаммов микроорганизмов, направление информации осуществляют в соответствии с правилами, изложенными выше.

## ИНДИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ, ОБУСЛОВЛИВАЮЩИХ СИНДРОМ ОСТРОЙ ДИАРЕИ, ГЕМОРРАГИЧЕСКИХ ГАСТРОЭНТЕРИТОВ И ЭНТЕРОКОЛИТОВ

Причиной синдрома острой диареи (гастроэнтерита, энтероко-

лита, энтерогемоколита, геморрагического гастроэнтерита), характеризующегося острым началом, тяжелым течением при отсутствии известных предрасполагающих факторов, могут являться возбудители бактериальной природы: *V. cholerae*, *B. anthracis*, *F. tularensis*, *Escherichia coli* O104:H4, *E. coli* O157:H7, относящиеся к ПБА II группы патогенности, и возбудители, относящиеся к III-IV группам патогенности: *Yersinia pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, сальмонеллы, шигеллы, норо-, рео-, энтеро- адено-, ротавирусы и др., а также биологические токсины (ботулинический, стафилококковый).

Исследуемым материалом являются испражнения, ректальные мазки, рвотные массы, желчь, кровь, сыворотка крови и секционный материал (фрагменты и содержимое кишечника, фрагменты печени, почки, селезенки, поджелудочной железы, мезентериальные лимфатические узлы).

**Световая микроскопия.** Микроскопия мазков и мазков-отпечатков с использованием окраски по Граму и Романовскому-Гимзе (возбудители бактериальной природы), Ребигеру (визуализация капсулы возбудителя сибирской язвы).

**МФА** используют при индикации возбудителей холеры, сибирской язвы, туляремии в исследуемом материале, а также после «подращивания» материала на средах обогащения. Приготовление, окрашивание специфическими иммуноглобулинами, просмотр мазков и оценку результатов осуществляют в соответствии с инструкцией по применению препарата. При обнаружении специфического свечения в препаратах выдают предварительный положительный ответ.

**ПЦР** используют для индикации возбудителей холеры, сибирской язвы, туляремии, энтерогеморрагических эшерихиозов, вирусов Ласса, Хунин, Мачупо, Марбург и Эбола и др. в исследуемом материале и на этапе идентификации культуры возбудителя. Исследования проводят в соответствии с требованиями действующих нормативно-методических документов и инструкций по применению препаратов по следующей схеме:

- выделение ДНК/РНК;
- проведение ОТ-ПЦР с семейство- и/или родо-, видоспецифическими праймерами для выявления вирусов I группы патогенности;
- постановка ПЦР для выявления ДНК возбудителей *Vibrio cholerae*, *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis*, *E. coli* O104:H4, *E. coli* O157:H7;

- постановка мультилокусной ПЦР для выявления и дифференциации ДНК (РНК) микроорганизмов рода *Shigella spp.* и энтероинвазивных *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, аденовирусов группы F и ротавирусов группы А, норовирусов и астровирусов, и ПЦР для выявления и дифференциации ДНК вирулентных и авирулентных штаммов *Yersinia enterocolitica* и штаммов *Yersinia pseudotuberculosis*.

Индикация биологических токсинов. Специфическую экспресс-индикацию токсинов проводят с помощью индикаторных иммунохроматографических элементов для определения ботулинического токсина типов А и В, холерного экзотоксина, стафилококкового энтеротоксина типа В или с использованием экспресс-наборов для определения токсинов методом обратной пассивной латексной агглютинации.

При необходимости осуществляют постановку биопробы: на ботулинический токсин (заражение двух белых мышей); на стафилококковый энтеротоксин (заражение четырех белых мышей).

Заражение биопробных животных. Для биологического обогащения проб используют метод подкожного (материал, загрязненный сопутствующей микрофлорой) или внутрибрюшинного заражения (чистый материал) белых мышей, морских свинок, серых хомячков, крольчат-сосунков.

**Идентификация возбудителей, обуславливающих синдром острой диареи.** Идентификацию культур *B. anthracis*, *V. cholerae*, *F. tularensis*, *E. coli O104:H4*, *E. coli O157:H7*, *Y. pseudotuberculosis* осуществляют в соответствии с требованиями нормативно-методических документов для каждого вида возбудителя.

При получении отрицательных результатов о наличии в исследуемом материале *V. cholerae*, *B. anthracis*, *F. tularensis*, *E. coli O104:H4*, *E. coli O157:H7*, *Y. pseudotuberculosis* исследования продолжают до выявления других возбудителей, обуславливающих данный синдром, с использованием всего спектра средств диагностики.

## ИНДИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ, ОБУСЛОВЛИВАЮЩИХ ОСТРЫЙ ДЕРМАТОЛОГИЧЕСКИЙ СИНДРОМ

Причиной острых лихорадочных заболеваний с сыпью или другими кожными проявлениями, а также при отсутствии известных predisposing факторов (острый дерматологический синдром) могут являться возбудители бактериальной – чумы, сибирской язвы, туляре-

мии, лептоспироза, сыпного тифа и вирусной природы – кори, краснухи, оспы, ветряной оспы, оспы обезьян, а также парвовирус В19.

Материалом для лабораторного исследования служат кровь, содержимое везикул, пустул, язв, бубонов, смывы из носоглотки, СМЖ, моча, секционный материал (головной мозг, мозговые оболочки, паренхиматозные органы, лимфатические узлы).

**Световая микроскопия.** Микроскопия мазков и мазков-отпечатков с использованием окраски по Граму и Романовскому-Гимзе (возбудители бактериальной природы), Ребигеру (визуализация капсулы возбудителя сибирской язвы), темнопольная микроскопия (для выявления возбудителя лептоспироза).

**МФА** используют при индикации возбудителей чумы, сибирской язвы и туляремии в исследуемом материале и после «подращивания» материала на средах обогащения, а также вируса оспы. Приготовление, окрашивание специфическими иммуноглобулинами, просмотр мазков и оценку результатов осуществляют в соответствии с инструкцией по применению препарата. При обнаружении специфического свечения в препаратах выдают предварительный положительный ответ.

**ПЦР** используют для индикации возбудителей чумы, сибирской язвы, туляремии, лептоспироза, оспы в исследуемом материале. Исследования проводят в соответствии с требованиями действующих нормативно-методических документов по следующей схеме:

- выделение ДНК/РНК;
- проведение ОТ-ПЦР с семейство- и/или родо-, видоспецифическими праймерами для выявления вирусов I группы патогенности;
- постановка ПЦР для выявления ДНК/РНК возбудителей чумы, сибирской язвы, туляремии, лептоспироза;
- постановка ПЦР для выявления ДНК/РНК вирусов краснухи, кори, ветряной оспы, парвовируса В19 (при необходимости).

**ИФА, РНГА, ИХА** для выявления антигенов и антител к возбудителям чумы, сибирской язвы, туляремии, лептоспироза, краснухи, кори (приведены в соответствующих разделах учебного пособия).

По результатам идентификации составляют паспорт штамма с указанием всех полученных характеристик.

**Идентификация возбудителей, обуславливающих острый дерматологический синдром.** Идентификацию культур *B. anthracis*, *F. tularensis* осуществляют в соответствии с требованиями нормативно-методических документов.

При получении отрицательных результатов о наличии в исследуемом материале *B. anthracis*, *F. tularensis*, *Leptospira spp.* исследования продолжают до выявления других возбудителей, обуславливающих данный синдром, с использованием всего спектра средств диагностики. По результатам идентификации составляют паспорт штамма с указанием всех полученных характеристик.

## ИНДИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ, ОБУСЛОВЛИВАЮЩИХ ОСТРЫЙ НЕВРОЛОГИЧЕСКИЙ СИНДРОМ

Причиной острой неврологической дисфункции с наличием одного или более таких симптомов, как нарушение ментальной функции, острый паралич, судороги, признаки раздражения менингеальных оболочек, произвольные движения или других неврологических симптомов (острый неврологический синдром), могут являться энтеровирусы, вирусы японского и клещевого энцефалитов, бешенства и других лиссавирусов, а также *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* и *Streptococcus pneumoniae*, возбудители чумы, лептоспироза, трипаносомоза, малярии.

Лабораторному исследованию подлежат кровь, СМЖ и секционный материал (головной мозг, спинной мозг, мозговые оболочки).

**Световая микроскопия.** Микроскопия мазков и мазков-отпечатков с использованием окраски по Граму и Романовскому-Гимзе (возбудители бактериальной природы), темнопольная микроскопия (для выявления возбудителя лептоспироза), исследование препаратов крови, приготовленных методом «тонкого мазка» и «толстой капли», окрашенных по Романовскому-Гимзе (для выявления возбудителя малярии).

**МФА** используют при индикации возбудителей чумы, японского и клещевого энцефалита и малярии в исследуемом материале. Приготовление, окрашивание специфическими иммуноглобулинами, просмотр мазков и оценку результатов осуществляют в соответствии с инструкцией по применению препарата. НМФА используют и для обнаружения антител к возбудителям флавивирусных инфекций. При обнаружении специфического свечения в препаратах выдают предварительный положительный ответ.

**ПЦР** используют для индикации энтеровирусов, вируса клещевого энцефалита, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* и *Y. pestis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Leptospira spp.* Исследования проводят в соответствии с требованиями действующих нормативно-методических документов.

**ИФА, РНГА, РСК, ИХА** - используют для выявления антигенов и/или антител к возбудителям малярии, японского энцефалита, клещевого энцефалита, *Y. pestis*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Leptospira spp.*

По результатам идентификации составляют паспорт штамма с указанием всех полученных характеристик.

## ИНДИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ, ОБУСЛОВЛИВАЮЩИХ ОСТРЫЙ РЕСПИРАТОРНЫЙ СИНДРОМ

Причиной общей интоксикации и лихорадки с поражением органов дыхания (озноб, боли в груди, кашель часто с серозной или серозно-геморрагической мокротой, одышка, тахикардия), сопровождаемой отеком легких и гипоксией (острый респираторный синдром), могут являться возбудители чумы, сибирской язвы, туляремии, дифтерии, микоплазмоза, легионеллеза, коклюша, скарлатины, лептоспироза, псевдотуберкулеза, хантавирусного пульмонального синдрома, гриппа, ТОРС, а также респираторно-синцитиальный вирус и другие возбудители острых респираторных вирусных инфекций человека.

Лабораторному исследованию подлежат смывы из полости носа и ротоглотки, мазки из полости носа и ротоглотки, носоглоточное отделяемое, мокрота, кровь, сыворотка крови, моча, целесообразно включать в исследование аспираты из трахеи, бронхоальвеолярный лаваж, плевральный выпот при возможности их забора; в случае летального исхода – секционный материал: ткань легких, фрагменты трахеи, бронхов, мазки со слизистой дыхательных путей, внутригрудные лимфатические узлы.

**Световая микроскопия.** Микроскопия мазков и мазков-отпечатков с использованием окраски по Граму (возбудители бактериальной природы), Ребигеру (визуализация капсулы возбудителя сибирской язвы), Романовскому-Гимзе (выявление возбудителей лептоспироза, туляремии), темнопольная микроскопия (выявление возбудителя лептоспироза с использованием препарата «раздавленная капля»).

**МФА** используют для индикации возбудителей чумы, туляремии, сибирской язвы, псевдотуберкулеза в исследуемом материале и после подрашивания материала на питательных средах, а также вирусов гриппа. НМФА используют и для обнаружения антител к вирусу SARS. Приготовление, окрашивание специфическими иммуноглобулинами и просмотр мазков осуществляют в соответствии с инструкцией по применению препарата.

**ПЦР** используют для индикации возбудителей чумы, сибирской язвы, туляремии, легионеллеза, возбудителей атипичных пневмоний, лептоспироза, псевдотуберкулеза, туберкулеза, хантавирусов, вирусов гриппа А, SARS, возбудителей других острых респираторных заболеваний в исследуемом материале и на этапе идентификации культуры возбудителя. Исследования проводят в соответствии с требованиями действующих нормативно-методических документов и инструкций по применению препаратов по следующей схеме:

- выделение ДНК/РНК;
- постановка ПЦР для выявления ДНК возбудителей чумы, сибирской язвы, туляремии, легионеллеза, лептоспироза, хантавирусов, вирусов гриппа А, SARS;
- постановка мультилокусной ПЦР для выявления возбудителей острых респираторных вирусных инфекций человека: респираторно-синцитиального вируса, метапневмовируса, вирусов парагриппа 1, 2, 3 и 4 типов, коронавируса, риновирусов, аденовирусов групп В, С и Е и бокавируса;
- постановка мультилокусной ПЦР для выявления *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydophila pneumoniae*;
- постановка мультилокусной ПЦР для выявления и дифференцирования микобактерий туберкулеза (*M. tuberculosis*, *M. bovis* и *M. bovis BCG*) и ПЦР для выявления и дифференциации ДНК вирулентных и авирулентных штаммов *Y. enterocolitica* и штаммов *Y. pseudotuberculosis*.

**ИФА, ИХА и другие серологические реакции** используют для выявления антигенов и/или антител классов М и G к возбудителям чумы, туляремии, легионеллеза, лептоспироза, псевдотуберкулеза, хантавирусов, вируса SARS.

При получении отрицательных результатов о наличии в исследуемом материале *Y. pestis*, *B. anthracis*, *F. tularensis* исследования продолжают до выявления других возбудителей респираторных инфекции с использованием всего спектра средств диагностики. По результатам идентификации составляют паспорт штамма с указанием всех полученных характеристик.

## ИНДИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ, ОБУСЛОВЛИВАЮЩИХ ОСТРЫЙ ЖЕЛТУШНЫЙ СИНДРОМ

Причиной острого начала желтухи с тяжелым течением болезни

при отсутствии известных предрасполагающих факторов могут являться возбудители гепатитов А, В, Е, желтой лихорадки, лептоспироза, псевдотуберкулеза, малярии.

Материалом для исследования при остром желтушном синдроме являются кровь, моча, фекалии, биоптаты печени, а также секционный материал: печень, селезенка.

**Световая микроскопия.** Микроскопия мазков и мазков-отпечатков с использованием окраски по Граму (возбудители бактериальной природы), Романовскому-Гимзе (выявление возбудителей лептоспироза), темнопольная микроскопия (выявление возбудителя лептоспироза с использованием препарата «раздавленная капля»).

**МФА** используют для индикации возбудителя желтой лихорадки и псевдотуберкулеза в исследуемом материале. Приготовление, окрашивание специфическими иммуноглобулинами и просмотр мазков осуществляют в соответствии с инструкцией по применению препарата.

**ПЦР** используют для выявления возбудителей вирусных гепатитов, желтой лихорадки, лептоспироза, псевдотуберкулеза, малярии.

**ИФА, ИХА и другие серологические реакции** используют для выявления антигенов и/или антител классов М и G желтой лихорадки, лептоспироза, псевдотуберкулеза.

При получении отрицательных результатов о наличии в исследуемом материале возбудителей лептоспироза исследования продолжают до выявления других возбудителей с использованием всего спектра средств диагностики. По результатам идентификации составляют паспорт штамма с указанием всех полученных характеристик.

## ИНДИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ, ОБУСЛОВЛИВАЮЩИХ ОСТРЫЙ ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКИЙ СИНДРОМ

Причиной острого начала конъюнктивита с субконъюнктивальными кровоизлияниями, сопровождающегося отеком и гиперемией век, обильным слизисто-гнойным отделяемым из глаз, жжением и светобоязнью или без таковых при отсутствии известных предрасполагающих факторов (острый офтальмологический синдром) могут являться возбудитель туляремии, адено- и энтеровирусы, хламидии.

Материалом для исследования при остром офтальмологическом синдроме являются кровь, соскобы с конъюнктивы, мазок из ротоглотки, СМЖ, фекалии, отделяемое везикул.

**Световая микроскопия.** Микроскопия мазков и мазков-отпечатков с использованием окраски по Граму, Романовскому-Гимзе.

**МФА** используют для индикации в исследуемом материале *Francisella tularensis*, адено- и энтеровирусов, хламидий. Приготовление, окрашивание специфическими иммуноглобулинами и просмотр мазков осуществляют в соответствии с инструкцией по применению препарата.

**ПЦР** применяют для выявления возбудителей туляремии, эпидемического аденовирусного кератоконъюнктивита, геморрагического энтеровирусного кератоконъюнктивита, трахомы.

**ИФА, другие серологические реакции** используют для выявления антигенов и/или антител классов М и G к возбудителям туляремии, эпидемического аденовирусного кератоконъюнктивита, геморрагического энтеровирусного кератоконъюнктивита, трахомы.

При получении отрицательных результатов о наличии в исследуемом материале возбудителей туляремии, эпидемического аденовирусного кератоконъюнктивита, геморрагического энтеровирусного кератоконъюнктивита, трахомы исследования продолжают до выявления других возбудителей, обуславливающих острый офтальмологический синдром с использованием всего спектра средств диагностики. По результатам идентификации составляют паспорт штамма с указанием всех полученных характеристик.

## ИНДИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ, ОБУСЛОВЛИВАЮЩИХ ОСТРЫЙ «СИСТЕМНЫЙ» СИНДРОМ

Причиной острого начала лихорадочного заболевания, характеризующегося тремя или более симптомами, касающимися различных систем организма, (потеря аппетита и веса, тошнота и рвота, дискомфорт в брюшной полости, потливость и озноб, головная боль, боль в мышцах, суставах и спине, сыпь), при отсутствии известных предрасполагающих факторов (острый «системный» синдром) могут являться арбовирусные лихорадки, лихорадка Денге, хантавирусная инфекция, геморрагическая лихорадка Ласса, иксодовый клещевой боррелиоз, возвратный тиф, лихорадка долины Рифт, вирусный гепатит, как компонент желтой лихорадки, а также возбудители чумы, сибирской язвы, бруцеллеза, брюшного тифа, лептоспироза.

Материалом для исследования при остром «системном» синдроме являются кровь, моча, фекалии, биоптаты печени, а также секцион-

ный материал: лимфатические узлы, печень, селезенка.

**Световая микроскопия.** Микроскопия мазков и мазков-отпечатков с использованием окраски по Граму (возбудители бактериальной природы), Ребигеру (визуализация капсулы возбудителя сибирской язвы), Романовскому-Гимзе (выявление возбудителей лептоспироза, возвратного тифа), темнопольная микроскопия (выявление возбудителя лептоспироза, иксодового клещевого боррелиоза с использованием препарата «раздавленная капля»).

**МФА** используют для индикации в исследуемом материале возбудителей чумы, сибирской язвы, бруцеллеза, флавивирусов. НМФА используют для обнаружения антител к возбудителям ГЛПС. Приготовление, окрашивание специфическими иммуноглобулинами и просмотр мазков осуществляют в соответствии с инструкцией по применению препарата.

**ПЦР** проводят для выявления возбудителей арбовирусных лихорадок (ВЗН, ККГЛ, ВКЭ, лихорадки Денге), хантавирусной инфекции, геморрагической лихорадки Ласса, иксодового клещевого боррелиоза, а также возбудителей чумы, сибирской язвы, бруцеллеза, лептоспироза.

**ИФА, ИХА и другие серологические реакции** применяют для выявления антигенов и/или антител классов М и G к возбудителям арбовирусных лихорадок (для выявления антител/антигенов Bunya-, Toga-, Flaviviridae и др.), хантавирусной инфекции, иксодового клещевого боррелиоза, а также возбудителей чумы, сибирской язвы, бруцеллеза, лептоспироза.

**Идентификация возбудителей, обуславливающих острый «системный» синдром.** Идентификацию культур возбудителей чумы, сибирской язвы, бруцеллеза, брюшного тифа, лептоспироза осуществляют в соответствии с нормативно-методическими документами для каждого вида возбудителя.

**Идентификация возбудителей, обуславливающих острый «системный» синдром неустановленного систематического положения.** При получении отрицательных результатов о наличии в исследуемом материале вышеуказанных возбудителей исследования продолжают до выявления других возбудителей, обуславливающих острый «системный» синдром, с использованием всего спектра средств диагностики. По результатам идентификации составляют паспорт штамма с указанием всех полученных характеристик.

## ПОРЯДОК ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОБ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ ПРИ ПРЕДНАМЕРЕННОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПАТОГЕННЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ АГЕНТОВ

Перечень потенциально опасных биологических агентов, представляющих наибольшую опасность при биотеррористической атаке

### **Категория А:**

- *Variola major* (оспа) и другие покс-вирусы;
- аренавирусы (вирус ЛХМ, вирусы Хунин, Мачупо, Гуанарито, Ласса);
- буньявирусы (хантавирусы, вирус лихорадки долины Рифт);
- флавивирусы (вирус Денге);
- филовirusы (вирусы Эбола, Марбург);
- *Bacillus anthracis* (возбудитель сибирской язвы);
- *Yersinia pestis* (возбудитель чумы);
- *Francisella tularensis* (возбудитель туляремии);
- *Clostridium botulinum* (возбудитель ботулизма).

### **Категория В:**

- *Burkholderia pseudomallei* (возбудитель мелиоидоза);
- *Coxiella burnetti* (возбудитель лихорадки Ку);
- *Brucella species* (возбудитель бруцеллеза);
- *Burkholderia mallei* (возбудитель сапа);
- *Ricinus communis* (токсин РИЦИН);
- *Clostridium perfringens* (Эпсилонтоксин);
- Стафилококковый энтеротоксин В;
- *Rickettsia prowazekii* (возбудитель сыпного тифа).

### **Патогены, угрожающие пищевой и водной безопасности:**

#### **бактерии:**

- *Vibrio cholerae*;
- энтерогеморрагические *E. coli*;
- шигеллы;
- сальмонеллы;
- *Listeria monocytogenes*;
- *Campylobacter jejuni*;
- *Yersinia enterocolitica*;

#### **вирусы:**

- *Caliciviruses*;
- вирус гепатита А.

**Дополнительные вирусные энцефалиты:** вирус лихорадки Западного Нила, Ла Кросс, Калифорнийский энцефалит, Венесуэльский энцефаломиелит лошадей, Восточный энцефаломиелит лошадей, Западный энцефаломиелит лошадей, вирус японского энцефалита, вирус болезни леса Кьяссанур.

**Категория С:**

- вирусы клещевых геморрагических лихорадок (вирус Конго-Крымской геморрагической лихорадки);
- вирусы клещевых энцефалитов;
- возбудитель желтой лихорадки;
- устойчивые к лекарствам формы туберкулеза;
- возбудители гриппа;
- возбудители риккетсиозов;
- бешенство.

**ИНДИКАЦИЯ НЕИЗВЕСТНЫХ ПАТОГЕННЫХ  
БИОЛОГИЧЕСКИХ АГЕНТОВ В ОБЪЕКТАХ  
ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ**

Подготовка проб к исследованию: перевод в жидкую фазу; концентрация и деление на аликвоты.

**Световая микроскопия.** Микроскопия мазков и мазков-отпечатков, окрашенных по Граму, Романовскому-Гимзе (возбудители бактериальной природы), Цилю-Нильсону (визуализация спор возбудителя сибирской язвы), темнопольная микроскопия (выявление возбудителя лептоспироза, иксодового клещевого боррелиоза с использованием препарата «раздавленная капля»).

**МФА** используют для индикации в исследуемом материале возбудителей чумы, сибирской язвы, бруцеллеза, туляремии, бруцеллеза, мелиоидоза, холеры, флави- и хантавирусов. Приготовление, окрашивание специфическими иммуноглобулинами и просмотр мазков осуществляют в соответствии с инструкцией по применению препарата.

**ПЦР** осуществляют для выявления возбудителей арбовирусных лихорадок, лихорадки Денге, хантавирусной инфекции, геморрагической лихорадки Ласса, вирусного гепатита, а также возбудителей чумы, сибирской язвы, бруцеллеза, туляремии, сапа, мелиоидоза, холеры, энтерогеморрагических эшерихий, лептоспироза.

Исследования проводят в соответствии с требованиями действующей

щих нормативно-методических документов и инструкции по применению препаратов по следующей схеме:

- выделение ДНК/РНК
- проведение ОТ-ПЦР с семейство- и/или родо-, видоспецифичными праймерами для выявления вирусов I-II группы патогенности
- постановка ПЦР для выявления ДНК/РНК возбудителей чумы, сибирской язвы, бруцеллеза, туляремии, сапа, мелиоидоза, холеры, энтерогеморрагических эшерихий, лептоспироза.

**ИФА, ИХА и другие серологические реакции** используют для выявления антигенов возбудителей арбовирусных лихорадок, хантавирусной инфекции, вирусных гепатитов, а также возбудителей чумы, сибирской язвы, бруцеллеза, энтерогеморрагических эшерихий, брюшного тифа, лептоспироза.

**Заражение биопробных животных.** Заражение биопробных животных осуществляют только после получения отрицательных результатов индикации на наличие в материале вирусов I группы патогенности. Для биологического обогащения проб используют метод подкожного и накожного заражения белых мышей, морских свинок, серых хомячков.

## ПОРЯДОК ОРГАНИЗАЦИИ И ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТ ПРИ ИНДИКАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Индикацию и идентификацию возбудителей опасных инфекционных болезней вирусной природы при исследовании проб клинического материала и объектов окружающей среды осуществляют с помощью следующих методов в соответствии со схемой:

- экспресс-диагностика (МФА, ИХА);
- ускоренная диагностика (ПЦР, ИФА, серологические реакции).
- выделение вируса на чувствительной биологической модели.

При невозможности установления возбудителя заболевания с использованием существующих ПЦР тест-систем используют дополнительно электронную микроскопию и молекулярно-генетические методы (в том числе секвенирование отдельных фрагментов и полногеномное секвенирование).

Для выделения, идентификации возбудителя и определения его вирулентных свойств осуществляют заражение перевиваемых культур клеток (Vero, СПЭВ), куриных эмбрионов и биопробных живот-

ных (новорожденные белые мыши-сосунки).

При выделении вируса с неизвестными ранее свойствами и невозможности его систематизировать по результатам секвенирования (нуклеотидной последовательности генома) составляют паспорт штамма с указанием всех полученных характеристик.

При выявлении в материале генетических маркеров вирусов II - III группы патогенности (вирусов денге, желтой лихорадки и других флавивирусов, вируса лихорадки Рифт-Валли, ККГЛ, хантавирусов, вызывающих геморрагический синдром, и др.) аликвоты проб направляют по согласованию в Референс-центры по соответствующей нозологии для дальнейших вирусологических исследований.

## **Приложение 1** МУ 1.3.2569-09

### **ЗАБОР МАТЕРИАЛА НА ИССЛЕДОВАНИЕ ОТ ЧЕЛОВЕКА, ЖИВОТНЫХ, НАСЕКОМЫХ И ОБЪЕКТОВ О КРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ**

#### **1. Требования к забору биологического материала**

##### **1.1. Кровь (плазма), сыворотка крови**

Пробы крови (плазмы) используют при проведении качественных и количественных исследований, пробы сыворотки крови используют только при проведении качественных исследований с помощью МАНК.

*Взятие материала:* Для получения плазмы забор крови производят натошак или через 3 часа после приема пищи из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8 - 1,1 мм) в специальную вакуумную систему типа «Vacuett» (сиреневые крышки – 6 % ЭДТА) или одноразовым шприцем в пластиковые пробирки с цитратом натрия (3,8 %-ный раствор цитрата Na в соотношении 1:9). Пробирку закрывают крышкой и аккуратно переворачивают несколько раз вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом (в противном случае кровь свернется и выделение ДНК/РНК станет невозможным). Гепарин в качестве антикоагулянта использовать нельзя!

Для получения сыворотки забор крови проводят натошак из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8 - 1,1 мм) в одноразовые пробирки без антикоагулянта.

*Предварительная обработка проб.* Плазму крови получают центрифугированием пробирок с цельной кровью при 800 - 1600 g в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем отбирают плазму в количестве не менее 1 мл отдельными наконечниками с фильтром (пастеровскими пипетками) в стерильные пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл.

Для получения сыворотки пробирки с кровью отстаивают при комнатной температуре в течение 30 мин до полного образования сгустка или помещают в термостат при 37 °С на 15 мин. Затем центрифугируют при 800-1600 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Сыворотку переносят отдельными наконечниками с фильтром (пастеровскими пипетками) в стерильные пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл. Сыворотка не должна быть гемолизированной.

Клетки крови (лейкоцитарную фракцию цельной крови, лейкоцитарную пленку) для выявления лейкотропных вирусов и т.д. следует отбирать после центрифугирования цельной крови и удаления плазмы. Используя наконечник с фильтром аккуратно собрать лейкоцитарную массу с поверхности осадка клеток в объеме 0,2 мл и перенести в стерильную пробирку объемом 1,5-2,0 мл.

### **Условия хранения и перевозки материала и предварительно обработанных проб**

Образцы цельной крови:

- при температуре от 2 °С до 8 °С – в течение 6 ч с момента взятия материала для количественного определения нуклеиновых кислот; в течение 12 ч – для качественного определения нуклеиновых кислот;
- при температуре от 2 °С до 8° С – в течение 1 суток для качественного и количественного определения ДНК (РНК) инфекционных агентов.

Недопустимо замораживание образцов цельной крови!

Образцы плазмы и сыворотки:

- при температуре от 2° С до 8 °С – в течение 5 суток;
- при температуре минус 20 °С – в течение года;
- при температуре минус 70 °С – длительно.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала, поэтому образцы плазмы или сыворотки для длительного хранения желательно разлить небольшими (0,1-0,2 мл) порциями в отдельные стерильные пробирки объемом 1,5 мл или 2,0 мл.

## **1.2. Моча**

*Взятие материала*

Для анализа отбирают первую порцию утренней мочи в количестве не меньше 20-30 мл в специальный сухой стерильный флакон на 50 мл.

Предварительная обработка проб. Взбалтывают флакон с мочой. Переносят 1 мл мочи, используя наконечник с фильтром, в стерильные одноразовые пробирки объемом 1,5 мл. Центрифугируют 5 мин при 10 000 g, при наличии большого количества солей ресуспендируют только верхний слой осадка солей в объеме 1 мл и затем снова центрируют. Используя вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой, полностью удаляют супернатант, не захватывая осадок. К осадку добавляют транспортную среду до конечного объема 0,2 мл, тщательно перемешивают содержимое на вортексе.

*Условия хранения и перевозки материала и предварительно обработанных проб*

Нативные и предварительно обработанные образцы мочи:

- при температуре от 2 °С до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре минус 20 °С – в течение 1 недели;
- при температуре минус 70 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

### **1.3. Фекалии**

*Взятие материала.* Используют пробы фекалий массой (объемом) примерно 1-3 г (1-3 мл). Исследование мазков неинформативно из-за низкого содержания в них возбудителей. Пробу в количестве 1 г (примерно) отдельным наконечником с фильтром или одноразовыми лопатками переносят в специальный стерильный флакон.

*Предварительная обработка проб.* При исследовании нативных фекалий без предшествующего замораживания готовят фекальную суспензию (при водянистой консистенции фекалий суспензию не готовят).

*Приготовление фекальной суспензии*

В соответствующее пробам количество микроцентрифужных пробирок (объемом 1,5 мл) вносят 0,8 мл фосфатного буфера (или стерильного изотонического раствора натрия хлорида). В каждую пробирку отдельным наконечником с фильтром (или одноразовыми лопатками) вносят 0,1 г (0,1 мл) фекалий и тщательно ресуспендируют на вортексе до образования гомогенной суспензии.

При невозможности исследования материала в течение суток

и/или необходимости длительного хранения к 10-20 %-ной суспензии фекалий в фосфатном буфере (или стерильном изотоническом растворе натрия хлорида) добавляют глицерин в конечной концентрации 10-15 %. Подготовленные таким образом пробы замораживают только после тщательной гомогенизации и экспозиции с глицерином в течение 30-40 мин.

*Приготовление бактериальной фракции фекалий для выявления бактериальных агентов.* Для приготовления бактериальной фракции фекалий используют фекалии водянистой консистенции, свежеприготовленную суспензию фекалий или суспензию, подвергавшуюся замораживанию с глицерином. Пробирки с суспензией (водянистыми фекалиями) центрифугируют при 7000-12 000 г в течение 5 мин. Отдельным наконечником с фильтром из каждой пробирки отбирают бактериальную фракцию в объеме 0,05 мл (верхняя бело-желтая часть образовавшегося осадка). При отсутствии осадка или бело-желтого пограничного слоя между осадком и супернатантом отбирают 0,1 мл со дна пробирки или с границы осадка или супернатанта, соответственно. Отобранную часть пробы, содержащую высокую концентрацию бактерий, переносят в новую микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл, содержащую 0,8 мл фосфатного буфера (или стерильного изотонического раствора натрия хлорида). Проводят тщательное ресуспендирование осадка на вортексе с последующим центрифугированием при 7000-12 000 г в течении 15 мин.

Супернатант удаляют, а осадок ресуспендируют на вортексе в 0,3 мл фосфатного буфера (стерильного изотонического раствора натрия хлорида).

*Приготовление осветленного экстракта фекалий для выявления вирусных агентов*

Для приготовления осветленного экстракта фекалий используют фекалии водянистой консистенции, свежеприготовленную суспензию фекалий или суспензию, подвергавшуюся замораживанию с глицерином. Взвесь фекалий интенсивно гомогенизируют на вортексе. Осветляют полученную суспензию путем центрифугирования при 10 000 г в течение 5 мин. Супернатант (0,1 мл) смешивают с отрицательным контрольным образцом (50 %-ная сыворотка крови крупного рогатого скота, разведенная фосфатно-солевым буфером, состав которого указан выше) (0,1 мл) в соотношении 1:1 и используют непосредственно для выделения ДНК или РНК. При необходимости

хранения супернатант отбирают в отдельную одноразовую пробирку.

*Условия хранения и перевозки материала и предварительно обработанных проб*

Образцы нативных фекалий:

- при комнатной температуре – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 °С до 8 °С – в течение 3 суток.

Фекальная суспензия с глицерином, бактериальная фракция и осветленный фекальный экстракт:

- при температуре минус 20 °С – в течение 1 недели;
- при температуре минус 70 °С – длительно.

#### **1.4. Спинномозговая жидкость (ликвор)**

*Взятие материала.* Спинномозговую жидкость в количестве не менее 1 мл собирают, используя одноразовые иглы, в одноразовые пластиковые пробирки объемом 1,5 или 2,0 мл.

Предварительная обработка проб не требуется.

*Условия хранения и перевозки материала:*

- при температуре от 2 °С до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре минус 20 °С – в течение 1 недели;
- при температуре минус 70 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

#### **1.5. Биопсийный и аутопсийный материал**

*Взятие материала.* Материал забирают из зоны предполагаемого местонахождения возбудителя инфекции, из поврежденной ткани или из пограничного с поврежденным местом участка. Кусочки ткани диаметром не более 5 мм помещают в одноразовые стерильные пробирки объемом 2 мл, содержащих соответствующую транспортную среду. Пробирку плотно закрывают. Макроаутоптит помещают в контейнер с физиологическим раствором или транспортной средой № 2.

*Предварительная обработка проб.* Микробиоптаты (пунктаты) или макроаутоптаты печени, селезенки, предстательной железы, желудочно-кишечного тракта, шейки матки и т.д., помещенные в микропробирки с закручивающимися крышками или в пробирки объемом 1,5 мл с защелкой, содержащие 0,1 мл транспортной среды, предобработки не требуют. Далее выделение нуклеиновых кислот проводят в соответствии с инструкцией к набору реагентов.

*Макробиоптаты или макроаутоптаты.* При выявлении вирусных агентов кусочки ткани массой 0,1-1 г помещают в охлажденную

фарфоровую ступку и добавляют охлажденный изотонической раствор хлорида натрия объемом 0,5-1 мл. Измельчают стерильными ножницами с последующим растиранием пестиком. Через ватный тампон отбирают надосадочную жидкость (0,1-0,2 мл) стерильным наконечником с фильтром в стерильные микропробирки.

При выявлении бактериальных агентов процесс подготовки макробиоптатов (макроаутоптатов) аналогичен, только ступку и изотонический раствор не охлаждают.

По другому способу биоптат непосредственно перед выделением нуклеиновых кислот помещают в жидкий азот, затем аккуратно измельчают его пестиком в предварительно охлажденной жидким азотом фарфоровой ступке. Взвешивают 100 мг кусочков ткани и растирают их в ступке в жидком азоте до порошка. Затем для выделения РНК порошок переносят в гомогенизатор и следуют инструкции по выделению РНК. Для выделения ДНК к полученному порошку добавляют равный объем стерильного физиологического раствора (0,1 мл), тщательно перемешивают и отбирают необходимый объем материала, согласно инструкции для выделения ДНК.

Фарфоровая посуда, а также гомогенизаторы должны быть предварительно обработаны хромпиком и простерилизованы. При гомогенизации нескольких образцов необходимо после каждой пробы протирать поверхность стола 0,2 %-ным раствором ДП-2Т, затем водой и 70 ° этиловым спиртом и менять перед обработкой следующей пробы перчатки.

*Условия хранения и перевозки материала.* Образцы биопсийного и аутопсийного материала, предназначенного для выделения ДНК или РНК:

- при комнатной температуре – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 °С до 8 °С – в течение 3 суток;
- при температуре минус 20 °С – в течение 1 недели;
- при температуре минус 70 °С – длительно.

### **1.6. Мокрота**

*Взятие материала.* Взятие материала осуществляют в количестве не менее 1,0 мл в одноразовые градуированные стерильные флаконы с широким горлом и завинчивающимися крышками объемом не менее 50 мл.

*Предварительная обработка проб.* Перед выделением нуклеиновых кислот необходимо провести разжижение мокроты, используя

раствор «Муколизин» ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  77,4 мМ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  22,6 мМ, бета-МЭ 99,4 мМ, 5 %-ный азид натрия в конечной концентрации 0,05 %). В емкость с мокротой добавляют «Муколизин» в соотношении 5:1 (5 частей «Муколизина» к 1 части мокроты), ориентируясь по градуировке емкости и стерильные стеклянные бусы. В процессе разжижения мокроты (20-30 мин.) емкость периодически встряхивают. Затем автоматической пипеткой, используя наконечник с фильтром, отбирают 1 мл разжиженной мокроты, помещают в пробирку с завинчивающейся крышкой или в микроцентрифужную пробирку с защелкой на 1,5 мл и центрифугируют при 5000-7000 г в течение 10 мин. Удалить 0,8 мл надосадочной жидкости, осадок клеток перемешать с 0,2 мл оставшейся жидкости

Допускается выделение ДНК/РНК из 0,1 мл разжиженной мокроты без стадии центрифугирования.

*Условия хранения и перевозки материала и предварительно обработанных проб:*

- при комнатной температуре – в течение 6 часов;
- при температуре от 2 °С до 8 °С – в течение 3 суток;
- при температуре минус 20 °С – в течение 1 недели;
- при температуре минус 70 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

### **1.7. Бронхо-альвеолярный лаваж или промывные воды бронхов**

*Взятие материала.* Взятие материала осуществляют в одноразовые, плотно завинчивающиеся пробирки объемом 50 мл.

*Предварительная обработка проб.* Промывные воды бронхов или бронхо-альвеолярный лаваж перемешивают переворачиванием пробирки. Автоматической пипеткой, используя наконечник с фильтром, отбирают 1 мл клинического материала, помещают в пробирку с завинчивающейся крышкой или пробирку с защелкой на 1,5 мл и центрифугируют при 7000 г в течение 10 мин. Удаляют 0,9 мл надосадочной жидкости, осадок клеток перемешивают с 0,1 мл оставшейся жидкости.

*Условия хранения и перевозки материала и предварительно обработанных проб:*

- при температуре от 2° С до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре минус 20 °С – в течение 1 недели;

- при температуре минус 70 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

### **1.8. Мазки из полости носа**

*Взятие материала.* Мазки (слизь) берут сухими стерильными ватными тампонами на пластиковой основе. Тампон вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2-3 см до нижней раковины. Затем тампон слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа. После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку с защелкивающейся крышкой, содержащую соответствующую транспортную среду (например, № 2) и аккуратно обламывают пластиковый стержень на расстоянии не более 0,5 см от рабочей части, оставляя рабочую часть зонда с материалом в транспортной среде. Пробирку плотно закрывают крышкой.

Предварительная обработка проб не требуется.

*Условия хранения и перевозки материала:*

- при комнатной температуре – в течение 6 ч;
- при температуре от 2 °С до 8 °С – в течение 3 суток;
- при температуре минус 20 °С – в течение 1 месяца;
- при температуре минус 70 °С – длительно.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

### **1.9. Мазки из ротоглотки**

*Взятие материала.* Мазки берут сухими стерильными ватными тампонами на пластиковой основе вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки. После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку со специальной транспортной средой (например, № 2) и аккуратно обламывают пластиковый стержень на расстоянии не более 0,5 см от рабочей части, оставляя рабочую часть зонда с материалом в транспортной среде. Пробирку плотно закрывают крышкой.

Предварительная обработка проб не требуется.

*Условия хранения материала:*

- при комнатной температуре – в течение 6 ч;
- при температуре от 2 °С до 8 °С – в течение 3 суток;

- при температуре минус 20° С – в течение 1 месяца;
- при температуре минус 70 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

#### **1.10. Смывы из полости носа**

*Взятие материала.* Взятие материала проводят в положении больного сидя с отклоненной назад головой путем введения с помощью одноразового шприца (зонда) теплого стерильного изотонического раствора натрия хлорида (3-5 мл) поочередно в каждый из носовых ходов. Промывную жидкость собирают через стерильную воронку в одну стерильную пробирку.

Не допускается повторное использование воронки без предварительного обеззараживания паром под давлением.

Предварительная обработка проб не требуется.

*Условия хранения материала:*

- при температуре от 2 °С до 8 °С – в течение 6 ч;
- при температуре минус 20 °С – в течение 1 недели;
- при температуре минус 70 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

#### **1.11. Смывы из ротоглотки**

*Взятие материала.* Перед взятием смывов из ротоглотки проводят предварительное полоскание полости рта водой. После этого проводят тщательное полоскание ротоглотки (в течение 10-15 с) 25-40 мл изотонического раствора натрия хлорида. Жидкость собирают через стерильную воронку в стерильный флакон на 50 мл.

Предварительная обработка проб не требуется.

*Условия хранения материала:*

- при комнатной температуре - в течение 6 ч;
- при температуре от 2 °С до 8 °С – в течение 3 суток;
- при температуре минус 20 °С – в течение 1 недели;
- при температуре минус 70 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

#### **1.12. Пунктат бубона**

*Взятие материала*

Взятие материала производят стерильным шприцем. Если бубон имеет сохранившуюся кожу (не вскрывшийся бубон), то ее проти-

рают предварительно спиртом. Пункцию бубона производят как в его центре, так и на периферии. Из вскрывшегося бубона материал забирают в местах с сохраненной тканью, а также берут отделяемое бубона. Исследуемый материал в количестве 0,1 - 0,3 мл помещают в пробирку с транспортной средой № 2 или ESP (см. п. 2).

Предварительная обработка проб не требуется.

*Условия хранения и перевозки материала:*

- при температуре от 2 °С до 8 С – в течение 1 суток;
- при температуре минус 20 °С – в течение 1 месяца;
- при температуре минус 70 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

### **1.13. Везикулы, пустулы**

*Взятие материала.* Перед взятием материала кожные элементы очищают ватным тампоном, смоченным эфиром или спиртом, затем прокалывают их у основания стерильной иглой или тонким капилляром пастеровской пипетки. Для ускорения поступления материала элемент сверху надавливают пинцетом. Корку или верхнюю часть везикул отделяют от кожи иглой, скальпелем. Исследуемый материал помещают в пробирку с транспортной средой N 2 или ESP (см. п. 2) или другой транспортной средой, рекомендованной производителем.

Предварительная обработка материала, условия хранения и перевозка в соответствии с п. 1.11.

### **1.14. Клещи, комары и эктопаразиты (вши и блохи)**

*Взятие материала.* После взятия и доставки материала комаров, клещей, блох и вшей в лабораторию, их обрабатывают эфиром до обездвижения, нанося каплю эфира на ватно-марлевую пробку. После определения вида и пола материал может быть объединен в пулы в зависимости от вида, пола, места и даты сбора и помещен в сухие чистые пробирки объемом 1,5 мл.

Группировку проб осуществляют в соответствии с МУ 3.1.1027-01 «Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих-переносчиков возбудителей природно-очаговых инфекций». При исследовании на чуму в одну пробу включают по 20-30 (не более 50) блох или мелких клещей, вшей. Иксодовых клещей при исследовании на чуму и другие природно-очаговые инфекции исследуют отдельно по фазам развития и в одну пробу берут пивших самок не более трех, голодных – до 30; нифм пивших м до

15, голодных – до 50; личинок пивших – до 30. При исследовании на туляремию в одну пробу объединяют до 50 имаго иксодовых клещей, 50-100 нифм и 100-200 личинок. Блох, гамазовых клещей, вшей исследуют до 100 особей в пробе. Из кровососущих двукрылых группируют пробы, включая в одну до 100 комаров, до 250 мошек и 20-25 слепней. При исследовании на арбовирусные инфекции комаров объединяют в пулы по 50-100 экземпляров. При необходимости проводят исследования отдельных особей.

*Предварительная обработка проб:*

- клещей помещают в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл, куда вносят 1 мл 96 ° этанола, встряхивают на вортексе и центрифугируют в течение 3-5 с при 2000 г для удаления капель с крышки пробирки;

- с помощью вакуумного отсасывателя отдельными наконечниками для каждой пробы удаляют спирт из пробирки;

- вносят в пробирку 1 мл 0,15 М раствора хлорида натрия, встряхивают пробирку и осаждают капли с крышки пробирки на микроцентрифуге в течение 3-5 с при 2000 г;

- с помощью вакуумного отсасывателя отдельными наконечниками для каждой пробы удаляют раствор хлорида натрия из пробирки;

- переносят клещей в стерильную фарфоровую чашку, добавляют 0,7-1,0 мл 0,15 М раствора хлорида натрия и гомогенизируют пробу;

- наконечником с фильтром переносят пробу в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл и центрифугируют при 1200 г в течение 2 мин. для осветления пробы.

РНК и ДНК выделяют из 0,1 мл надосадочной жидкости.

При выделении РНК и ДНК из комаров, блох и вшей используют данную методику обработки проб, за исключением этапов отмывки в 96 ° этаноле и 0,15 М растворе хлорида натрия. Насекомых сразу гомогенизируют в стерильной ступке в 0,15 М растворе хлорида натрия.

*Условия хранения материала и предварительно обработанных проб:*

Материал после разбора и формирования проб:

- при температуре минус 20 °С – в течение 1 месяца;

- при температуре минус 70 °С или в сосуде Дьюара с жидким азотом – длительно.

Обработанный материал (после гомогенизации и осветления) хра-

нится длительно при температуре минус 70 °С или в сосуде Дьюара с жидким азотом.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

## **2. Требования к забору материала из объектов окружающей среды**

### **2.1. Пищевые продукты**

*Взятие материала.* Пробы отбирают с соблюдением правил асептики в стерильные широкогорлые банки с помощью стерильной ложки, пинцета или ножа. Края банок обжигают над пламенем спиртовки. После закладки проб банки закрывают стерильной бумагой и перевязывают.

*Предварительная обработка проб.* Твердые пищевые продукты в количестве 1-10 г помещают в стерильную ступку, добавляют 0,9 %-ный раствор натрия хлорида в соотношении 1:10 и растирают до гомогенного состояния. Отстаивают и через ватный тампон отбирают надосадочную жидкость, из которой проводят выделение ДНК. Жидкие пищевые продукты в объеме 0,2 мл переносят в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл или 2,0 мл для выделения ДНК.

Условия хранения и перевозки материала:

- при температуре от 2 °С до 8 °С – в течение 1 суток;
- при температуре минус 20 °С – в течение 1 месяца;
- при температуре минус 70 °С – длительно.

Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

### **2.2. Почва, трава, фураж, подстилка**

*Взятие материала.* Пробы почвы с мест вероятного обсеменения патогенными микроорганизмами (мест вынужденного убоя скота, стоянок и водопоя животных) берут в количестве 20-30 г на глубине до 15 см, на территории скотомогильников – на глубине до 2 м с помощью почвенных буров. При этом верхний слой почвы (2-3 см) снимают.

Пробы фуража берут из поверхностного слоя – не менее 400 г на 4 кв. м поверхности при незатаренном типе хранения. Из брикетированного корма срезают верхний слой брикета. Отбор проб проводят сухим стерильным пробным щупом. Пробы грубых кормов (сено, солома) берут из разных мест скирды при помощи ножниц и пинцета из расчета одна проба (40 г) на 4 кв. м площади скирды. Отобранные

навески сена и соломы измельчают при помощи ножниц и пинцета на листе бумаги, затем помещают в банки. Зеленую массу, срезанную ножницами, помещают пинцетом в пробирку или в банку.

*Предварительная обработка проб.* К исследуемому материалу добавляют 0,9 %-ный раствор натрия хлорида 1:10, тщательно перемешивают в течение 15 мин., отстаивают в течение 10 мин. для оседания крупных частиц. Надосадочную жидкость дробно центрифугируют: первоначально в течение 2-3 мин. при 2000 g, затем супернатант центрифугируют в течение 15 мин. при 10 000 g. Осадок ресуспендируют в 0,2-0,5 мл дистиллированной воды.

Условия хранения и перевозки в соответствии с п. 2.1.

### **2.3. Вода, стоки, смывы**

*Взятие материала.* Водопроводную воду и воду из поверхностных водоемов для исследования берут в количестве 1 л на одну пробу в двух объемах по 500 мл в стерильную посуду с непроемаемой пробкой. Из водопроводных кранов отбор проб воды производят после предварительного обжигания их спиртовым факелом и спуска воды в течение 10 мин при полном открытии крана.

Хозяйственно-бытовые сточные воды отбирают для исследования двумя способами: в объеме 1 л в двух емкостях по 500 мл или тампонами, приготовленными из марлевых салфеток размером 10x15 см в 10-15 слоев. Последние закрепляют у места забора воды, через 1 сутки помещают в стерильную банку, содержащую физиологический раствор.

Смывы с поверхностей берут стерильными ватными тампонами или марлевыми салфетками. Перед взятием смывов тампоны или салфетки смачивают стерильным физиологическим раствором. После взятия смыва тампон (салфетку) погружают в емкость с физиологическим раствором.

*Предварительная обработка проб.* При выявлении бактериальных агентов и возбудителей микозов подготовку проб осуществляют методом дробного центрифугирования или вакуумной фильтрации на фильтры с размерами пор 0,45 и 0,65, 0,8, 1,2 мкм, соответственно. При выявлении вирусных агентов для подготовки проб используют только вакуумную фильтрацию на фильтры с размерами пор 0,2 мкм.

#### *Дробное центрифугирование*

Из отобранных образцов переносят по 125 мл в 4 центрифужных стакана объемом 250 мл с завинчивающимися крышками (или по 80

мл в 6 центрифужных пробирок, или по 50 мл в 10 центрифужных пробирок) и центрифугируют в течение 15 мин при 10 000 g. После этого осадок в каждом стакане (пробирке) ресуспендируют в 0,2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Полученные суспензии переносят в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл или 2,0 мл и центрифугируют при 10 000 g в течение 1 мин. Надосадочную жидкость отбирают наконечником с фильтром в микропробирку объемом 1,5 мл. Для выделения ДНК используют 0,1-0,2 мл надосадочной фракции.

Возможно центрифугирование одной пробы в одном центрифужном стакане (пробирке). Для этого в центрифужный стакан (пробирку) переносят пробу в объеме 50-125 мл и центрифугируют в течение 15 мин при 10 000 g, надосадочную жидкость удаляют, и в стакан (пробирку) снова добавляют соответствующий объем исследуемой пробы. Аналогичным образом центрифугируют весь объем исследуемой пробы. После последнего центрифугирования осадок ресуспендируют в 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и центрифугируют при 10 000 g в течение 1 мин. Надосадочную жидкость отбирают наконечником с фильтром в микропробирку объемом 1,5 мл. Для выделения ДНК используют 0,1-0,2 мл надосадочной фракции.

#### *Вакуумная фильтрация*

Для исследования используют стерильные фильтры с соответствующими размерами пор. В случае сильной загрязненности исходного образца воды механическими или масляными примесями, определяемыми визуально, его предварительно фильтруют на стеклянной воронке через стерильный ватно-марлевый или бумажный фильтр. Подготовленную таким образом воду пропускают через мембранный фильтр. После окончания фильтрации мембранные фильтры переносят обожженным анатомическим пинцетом в стерильный флакон (чашку Петри) или стерильный пластиковый пакет типа «Вихрь» объемом 100 мл, содержащих 10 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Воду после фильтрации обеззараживают добавлением сухой хлорной извести из расчета 200 г на 1 л. Для сорбции бактерий и вирусов с фильтра флакон встряхивают в течение 10 мин с помощью шейкера, фильтр внутри пакета типа «Вихрь» растирают вручную в течение 1 мин; фильтр, помещенный в чашку Петри, разрезают на мелкие куски ножницами инкубируют при покачивании в течение 10 мин. Далее смыв с поверхности фильтра переносят в стерильную пробирку. Для исследования методом ПЦР отбирают 1 мл в микроцентри-

фужные пробирки объемом 1,5 мл и центрифугируют при 10 000g в течение 10 мин. При выявлении бактериальных агентов оставляют 0,1 мл надосадочной жидкости, в которой ресуспендируют осадок. Из полученной суспензии проводят выделение ДНК. При выявлении вирусных агентов для выделения нуклеиновых кислот используют 0,1-0,2 мл надосадочной жидкости.

Условия хранения и перевозки в соответствии с п. 2.1.

## Приложение 2 МУ 1.3.2569-09

### ПОРЯДОК ОБРАБОТКИ И ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЯ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА, СОДЕРЖАЩЕГО (ПОДОЗРИТЕЛЬНОГО НА СОДЕРЖАНИЕ) МИКРООРГАНИЗМЫ I-IV ГРУПП ПАТОГЕННОСТИ, ПРИ ПРОВЕДЕНИИ РАБОТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АМПЛИФИКАЦИОННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

1. Обработка исследуемого материала, инфицированного бактериями I–IV групп патогенности и возбудителями глубоких микозов

1.1. Обработка исследуемого материала, инфицированного (подозрительного на инфицирование) микроорганизмами I–II групп патогенности (бактериями, не образующими споры, хламидиями, риккетсиями и возбудителями глубоких микозов), проводится следующим способом:

К исследуемому образцу добавляют мертиолят натрия до конечной концентрации 1:10 000 (0,01 %) и прогревают его при 56 °С в течение 30 мин. Затем, 100 мкл образца переносят в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл, добавляют лизирующий раствор, приготовленный на основе 6 М гуанидинизотиоцианата, в объеме, указанном в инструкции по применению к набору реагентов и инкубируют 15 мин при 65 °С. После выполнения данных процедур материал считается обеззараженным.

1.2. Обработка исследуемого материала, инфицированного (подозрительного на инфицирование) микроорганизмами III-IV групп патогенности (вирусами, хламидиями, риккетсиями и бактериями, не образующими споры) проводится одним из следующих способов:

1.2.1. Способ-1. Прогревание исследуемого образца при 100 °С в течение 30 мин.

1.2.2. Способ-2. К 100 мкл исследуемого образца добавляют лизирующий раствор, приготовленный на основе 6 М гуанидинизотиоцианата в объеме, указанном в инструкции по применению к набору реагентов (тест-системе) с последующей его инкубацией в течение 15 мин. при 65 °С.

После выполнения процедуры 2.2.1. или 2.2.2. материал считается обеззараженным.

1.3. Обработка исследуемого материала, инфицированного (подозрительного на инфицирование) бактериями II–IV групп патогенности, образующими споры, проводится следующим способом:

Исследуемый материал в количестве 0,1 мл засевают в пробирки с 0,9 мл бульона Хоттингера, рН 7,2 и инкубируют с аэрацией при 37 °С в течение 2,5 ч. Добавляют пенициллин до конечной концентрации 1000 ед/мл и инкубируют при 37 °С в течение 15 мин. После инкубации с пенициллином, исследуемый материал прогревают на водяной бане в течение 10 мин при температуре 100 °С. Затем 100 мкл обработанного образца переносят в пробирки объемом 1,5 мл и добавляют лизирующий раствор, приготовленный на основе 6 М гуанидинтиоизоцианата в объеме, указанном в инструкции по применению к набору реагентов, и инкубируют 15 мин при 65 °С. После выполнения данных процедур материал считается обеззараженным.

2. Обработка исследуемого материала, инфицированного вирусами I–II групп патогенности

2.1. Обработка исследуемого материала, инфицированного вирусом натуральной оспы, проводится следующим способом:

Материал (100 мкл) помещают в пробирку объемом 1,5 мл, добавляют 400 мкл лизирующего буферного раствора, содержащего 100 мМ Трис-НСl (рН=8), 100 мМ ЭДТА, 100 мМ NaCl, 1 % SDS, и инкубируют 10 мин при температуре 65 °С. Добавляют 50 мкл раствора протеиназы К (10 мг/мл), перемешивают и инкубируют в течение 1 часа при 56 °С. Центрифугируют в течение 5 мин при 14 000 об/мин для осаждения нерастворенных частиц. Супернатант переносят в стерильные пробирки объемом 1,5 мл, добавляют равный объема смеси фенол/хлороформ (рН 8,0) и тщательно перемешивают. Затем центрифугируют в течение 5 мин при 10 000 g. Переносят верхнюю водную фазу, содержащую раствор фенола и ДНК, в новую пробирку, добавляют 1/10 по объему 3 М ацетата натрия (рН 5.5), 30-40 мкг РНК-носителя (1 мкл раствора РНК-носителя с концентрацией 30-40 мкг/мкл) и равный объем изо-

пропанола. Затем центрифугируют в течение 15 мин при 10 000 g при 4 °С. Полученный осадок промывают добавлением 1 мл 70 % этанола и центрифугированием в течение 5 мин при 14 000 об/мин при 4 °С.

После выполнения данных процедур материал считается обеззараженным.

2.2. Обработка исследуемого материала, инфицированного вирусами I–II групп патогенности (кроме вируса оспы), содержащего инфекционную (позитивную) РНК, проводится следующим способом:

Материал (100 мкл) помещают в пробирку объемом 1,5 мл, добавляют 500 мкл лизирующего буфера на основе 6 М гуанидинизотиоцианата и фенола (1:1), и инкубируют 20 мин при температуре 65 °С. Затем выделяют РНК, используя метод нуклеосорбции на силикагеле, начиная с этапа добавления сорбента, либо метод осаждения РНК этанолом в присутствии 0,3 М ацетата натрия. Обратную транскрипцию выполняют в соответствии с инструкцией по применению к набору реагентов. Затем в образцы с кДНК добавляют РНКазу А до конечной концентрации 25 мкг/мл. После выполнения данных процедур материал считается обеззараженным.

2.3. Обработка исследуемого материала, инфицированного (подозрительного на инфицирование) вирусами I–II групп патогенности, содержащих неинфекционную (негативную) РНК или ДНК проводится следующим образом:

Материал (100 мкл) помещают в пробирку объемом 1,5 мл, добавляют 500 мкл лизирующего буфера, на основе 6 М гуанидинизотиоцианата и фенола (1:1) и инкубируют 20 мин при температуре 65 °С. После выполнения данных процедур материал считается обеззараженным.

2.4. Обработка исследуемого материала, подозрительного на инфицирование высокопатогенным неизвестным возбудителем, проводится в соответствии с пп. 2.3. и (или) 3.1. Работа с таким материалом на всех этапах исследования осуществляется с применением специальных средств индивидуальной защиты, согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Таблица 14

**Препараты и тест-системы для специфической индикации  
опасных инфекционных болезней**

№ № п/п	Наименование препарата	Разработчик
ЧУМА		
1	Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие чумные адсорбированные лошадиные, лиофилизат для диагностических целей	ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора
2	Иммуноглобулины диагностические чумные адсорбированные лошадиные для реакции агглютинации на стекле, лиофилизат для диагностических целей	«
3	Сыворотка чумная антифаговая, лиофилизат для диагностических целей	«
4	Тест-система дот-иммуоферментная для детекции чумного микроба моноклональная ИФАПестФ1-М	«
5	Тест-система для выявления ДНК <i>Yersinia pestis</i> методом полимеразной цепной реакции (ГенПест)	«
6	Набор реагентов для выявления ДНК <i>Yersinia pestis</i> методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени (Ген <i>Yersinia pestis</i> индикация – РГФ)»	«
7	Набор реагентов для ускоренной идентификации штаммов <i>Yersinia pestis</i> методом мультилокусной полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени (Ген <i>Yersinia pestis</i> идентификация – РГФ)	«
8	Набор реагентов для выявления ДНК <i>Yersinia pestis</i> в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® <i>Yersinia pestis</i> -FL»	ФБУН Центральный НИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, ООО «ИнтерЛабСервис»

№ № п/п	Наименование препарата	Разработчик
9	Набор реагентов для иммунохроматографического экспресс-выявления и идентификации возбудителя чумы (ИХ тест-система <i>Y. pestis</i> )	ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора
10	Набор реагентов для выявления ДНК возбудителей чумы, сибирской язвы и туляремии методом ПЦР в режиме реального времени «MULTI-FLU»	«
11	Набор реагентов для выявления и идентификации ДНК возбудителя чумы методом ПЦР-РВ «ОМ-Скрин-Чума-РВ»	НПК «Синтол»
ХОЛЕРА		
1	Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие холерные адсорбированные лошадиные, лиофилизат для диагностических целей	ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора
2	Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие холерные O139 адсорбированные кроличьи, лиофилизат для диагностических целей	«
3	Сыворотка диагностическая холерная O1 адсорбированная сухая для реакции агглютинации (РА)	«
4	Тест-система для выявления ДНК <i>Vibrio cholerae</i> (ctx A+) методом полимеразной цепной реакции (ГенХол)	«
5	Набор реагентов для выявления ДНК <i>Vibrio cholerae</i> и идентификации патогенных штаммов <i>Vibrio cholerae</i> в биологическом материале и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® <i>Vibrio cholerae-FL</i> »	ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, ООО «ИнтерЛабСервис»

№ № п/п	Наименование препарата	Разработчик
6	Сыворотка диагностическая холерная не О1 группы О139 адсорбированная кроличья для РА, лиофилизат для диагностических целей	ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора
7	Набор реагентов тест-система иммуноферментная магноимносорбентная для выявления холерного вибриона («ИФА-МИС-Холера-СтавНИПЧИ»)	ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора
<b>СИБИРСКАЯ ЯЗВА</b>		
1	Набор реагентов «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие сибирезвенные неадсорбированные сухие»	Филиал «Медгамал» ФГБУ «НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздравсоцразвития России
2	Альбумин бычий или бараний, меченный родамином, сухой	«
3	Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие сибирезвенные споровые адсорбированные сухие	ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора
4	Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие сибирезвенные вегетативные адсорбированные сухие	«
5	Набор реагентов для иммунохроматографического экспресс-выявления и идентификации спор возбудителя сибирской язвы (ИХ тест <i>V.anthraxis</i> )	ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора
6	Набор реагентов для определения спор <i>Bacillus anthracis</i> в реакции латекс-агглютинации	«

№ № п/п	Наименование препарата	Разработчик
7	Набор реагентов для выявления ДНК возбудителей чумы, сибирской язвы и туляремии методом ПЦР в режиме реального времени «MULTI-FLU»	«
9	Набор реагентов. Диагностикум эритроцитарный сибирезвенный антигенный сухой	ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора
10	Тест-система для выявления ДНК <i>B.antracis</i> рХО1+ методом ПЦР (ГенСиб)	ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора
11	Набор реагентов для выявления ДНК <i>Bacillus anthracis</i> в биологическом материале и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» «АмплиСенс® <i>Bacillus anthracis</i> -FRT»	ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, ООО «ИнтерЛабСервис»
<b>ТУЛЯРЕМИЯ</b>		
1	Набор реагентов «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие туляремиальные сухие»	Филиал «Медгамал» ФГБУ «НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздравсоцразвития России, Москва
2	Набор реагентов.  Альбумин бычий или бараний, меченный родамином, сухой	«

№ № п/п	Наименование препарата	Разработчик
3	Набор реагентов. Тест-система диагностическая для выявления возбудителя туляремии в иммуноферментном анализе (ИФА) «ИФА-Тул-СтавНИПЧИ»	ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора
4	Набор реагентов диагностикум эритроцитарный туляремийный антигенный жидкий («РНГА-Тул-Аг-СтавНИПЧИ»)	«
5	Набор реагентов диагностикум эритроцитарный туляремийный иммуноглобулиновый жидкий («РНГА-Тул-Иг-СтавНИПЧИ»)	«
6	Набор реагентов для иммунохроматографического экспресс-выявления и идентификации возбудителя туляремии (ИХ тест <i>F.tularensis</i> )	ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора
7	Диагностикум туляремийный жидкий для объемной и кровянокапельной реакции агглютинации	ФГУП «НПО «Микроген» Минздравсоцразвития России
8	Диагностикум туляремийный цветной сухой для реакции агглютинации (РА) на стекле, микрореакции агглютинации (МРА)	ФКУЗ «Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора
9	Набор реагентов для выявления ДНК <i>Francisella tularensis</i> методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени (Ген <i>Francisella tularensis</i> – РГФ)	ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

№ № п/п	Наименование препарата	Разработчик
10	Набор реагентов для выявления ДНК <i>Francisella tularensis</i> методом полимеразной цепной реакции с электрофоретическим учетом результатов (Ген <i>Francisella tularensis</i> – РЭФ)	«
11	Набор реагентов для определения возбудителя туляремии <i>Francisella tularensis</i> в реакции латекс-агглютинации	ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора
12	Набор реагентов для выявления ДНК возбудителей чумы, сибирской язвы и туляремии методом ПЦР в режиме реального времени «MULTI-FLU»	«
<b>БРУЦЕЛЛЕЗ</b>		
1	Бруцелла-тест для выявления антител против бруцелл с помощью реакции агглютинации (Райта) и реакции агглютинации (Хеддльсона)	Филиал «Медгамал» ФГБУ «НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздравсоцразвития РФ
2	Набор реагентов «Диагностикум бруцеллезный жидкий для реакции агглютинации»	Филиал «Медгамал» ФГБУ «НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздравсоцразвития РФ  ФКУЗ «Ставропольский научно- исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора
3	Набор реагентов «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие бруцеллезные сухие»	Филиал «Медгамал» ФГБУ «НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздравсоцразвития РФ
4	ПЦР-тест-система для выявления ДНК <i>Brucella melitensis</i> «Bru»	ООО «Лаборатория Изоген»

№ № п/п	Наименование препарата	Разработчик
5	Тест-система для выявления ДНК <i>Brucella spp.</i> методом полимеразной цепной реакции (Ген-Бру)	ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора
6	Сыворотка диагностическая поливалентная бруцеллезная сухая для реакции агглютинации (РА)	ФКУЗ «Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора
7	Набор реагентов для выявления ДНК бактерий <i>Brucella spp.</i> в биологическом материале и культурах микроорганизмов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® <i>Brucella spp.</i> -FL	ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, ООО «ИнтерЛабСервис»
8	Набор реагентов тест-система диагностическая для выявления возбудителя бруцеллеза в иммуноферментном анализе (ИФА) («ИФА- Бру-СтавНИПЧИ»)	ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора»
9	Набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к возбудителю бруцеллеза «Бруцелла-IgG-ИФА-БЕСТ	ЗАО «ВЕКТОР-БЕСТ»
10	Набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса M к возбудителю бруцеллеза «Бруцелла-IgM-ИФА-БЕСТ	ЗАО «ВЕКТОР-БЕСТ»

№ № п/п	Наименование препарата	Разработчик
11	<i>Brucella abortus</i> , IgA, полуколич. опред.	Euroimmun AG, Германия (ЗАО «Аналитика»)
12	<i>Brucella abortus</i> , IgG, количеств. опред.	Euroimmun AG, Германия (ЗАО «Аналитика»)
13	<i>Brucella abortus</i> , IgM, полуколич. опред.	«
<b>САП и МЕЛИОИДОЗ</b>		
1	Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие сапные моноклональные сухие	ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора
2	Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие мелиоидозные моноклональные сухие	«
3	Набор реагентов «Диагностикум эритроцитарный сапной и мелиоидозный иммуноглобулиновый сухой»	«
4	Набор реагентов для выявления ДНК возбудителей сапа ( <i>Burkholderia mallei</i> ) и мелиоидоза ( <i>Burkholderia pseudomallei</i> ) методом полимеразной цепной реакции.	«
<b>ОРТОПОКСВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ</b>		
1	Иммуноглобулин диагностический оспенный люминесцирующий сухой	ФГУП «НПО «Микроген» Минздравсоцразвития России
2	Диагностикум оспенный сухой для РТГА и РП	«
3	Сыворотка диагностическая оспенная сухая	«
4	Набор реагентов Тест-система иммуноферментная для определения антител к ортопоксвирусам	«
5	Набор реагентов Тест-система иммуноферментная для выявления антигена ортопоксвирусов	«

№ № п/п	Наименование препарата	Разработчик
6	Набор реагентов для выявления ДНК вирусов натуральной оспы, оспы обезьян, оспы, коров, осповакцины методом мультиплексной полимеразной цепной реакции «ВЕКТОР-МПЦР-ОСПА»	ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора
<b>ЛИХОРАДКА ЗАПАДНОГО НИЛА</b>		
1	Набор реагентов для выявления РНК вируса Западного Нила методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции с электрофоретическим учетом результатов (ГенНил – РЭФ)	ФКУН «Российский научно- исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора
2	Набор реагентов для выявления РНК вируса Западного Нила в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® WNV-FL»	ФБУН «Центральный научно- исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, ООО «ИнтерЛабСервис»
3	Вирус Западного Нила, IgM, полуколич. опред. (ИФА)	Euroimmun AG, Гер- мания (ЗАО «Анали- тика»)
4	Вирус Западного Нила, IgG, количествен. опред. (ИФА)	Euroimmun AG, Гер- мания (ЗАО «Анали- тика»)
5	Вирус Западного Нила, IgG, опред. авидности (ИФА)	«
6	Вирус Западного Нила // Anti-West Nile Virus ИФТ, IgG (Непрямой МФА)	«
7	Вирус Западного Нила // Anti-West Nile Virus ИФТ, IgM (Непрямой МФА)	«
8	Вирус Западного Нила // Anti-West Nile Virus ИФТ, определение авидности (Непрямой МФА)	«

№ № п/п	Наименование препарата	Разработчик
9	Вирус клещевого энцефалита / вирус Западного Нила / вирус японского энцефалита / вирус желтой лихорадки (Мозаика Флаivirus 1), IgG (Непрямой МФА)	«
10	Вирус клещевого энцефалита / вирус Западного Нила / вирус японского энцефалита / вирус желтой лихорадки (Мозаика Флаivirus 1), IgM (Непрямой МФА)	«
11	Вирус клещевого энцефалита / вирус Западного Нила / вирус японского энцефалита / вирус желтой лихорадки / вирус Денге (типы 1-4) (Мозаика Флавивирус 2), IgG (Непрямой МФА)	«
12	Вирус клещевого энцефалита / вирус Западного Нила / вирус японского энцефалита / вирус желтой лихорадки / вирус Денге (типы 1-4) (Мозаика Флавивирус 2), IgM (Непрямой МФА)	«
<b>КРЫМСКАЯ ГЕМОМРАГИЧЕСКАЯ ЛИХОРАДКА (ВЫЗВАННАЯ ВИРУСОМ КОНГО)</b>		
1	Набор реагентов для выявления РНК вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ) методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции с электрофоретическим учетом результатов (ГенКонго-РЭФ)	ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора
2	ВектоКрым-КГЛ-IgM  Набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса М к вирусу Крымской-Конго геморрагической лихорадки	ЗАО «Вектор-Бест»
3	ВектоКрым-КГЛ-IgG  Набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к вирусу Крымской-Конго геморрагической лихорадки	«

№ № п/п	Наименование препарата	Разработчик
4	ВектоКрым-КГЛ-антиген Набор реагентов для иммуноферментного выявления антигена вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки	«
5	Вирус Крымской-Конго геморрагической лихорадки (Мозаика 2) IgM и IgG	Euroimmun AG, Германия (ЗАО «Аналитика»)
<b>КЛЕЩЕВОЙ ВИРУСНЫЙ ЭНЦЕФАЛИТ</b>		
1	Набор реагентов для выявления РНК/ДНК возбудителей инфекций, передающихся иксодовыми клещами TBEV, <i>Borellia burgdorferi sl</i> , <i>Anaplasma phagocytophilum</i> , <i>Ehrlichia chaffeensis</i> / <i>Ehrlichia muris</i> , в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® TBEV, <i>B. burgdorferi sl</i> , <i>A. phagocytophilum</i> , <i>E. chaffeensis</i> / <i>E. muris</i> -FL»	ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, ООО «ИнтерЛабСервис»
2	«РеалБест РНК ВКЭ» Набор реагентов для выявления РНК вируса клещевого энцефалита методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени	ЗАО «Вектор-Бест»
3	Диагностикум клещевого энцефалита сухой для РТГА, РСК, РРГ	ФГУП «НПО «Микроген» Минздравсоцразвития России
4	Набор реагентов «ИФА ТС АГ ВКЭ» Тест-система иммуноферментная для выявления антигена вируса клещевого энцефалита	«
5	«ВектоВКЭ - антиген» Набор реагентов для иммуноферментного выявления антигена вируса клещевого энцефалита	ЗАО «Вектор-Бест»
6	«ВектоВКЭ - IgG» Набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к вирусу клещевого энцефалита	«

№ № п/п	Наименование препарата	Разработчик
7	«ВектоВКЭ - IgM» Набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса М к вирусу клещевого энцефалита.	«
8	«ДС-ИФА-АНТИ-ВКЭ-Г» Тест-система иммуноферментная для выявления антител класса G к вирусу клещевого энцефалита в сыворотке и плазме крови человека	ООО «НПО «Диагностические системы»
9	«ДС-ИФА-АНТИ-ВКЭ-М» Тест-система иммуноферментная для выявления антител класса М к вирусу клещевого энцефалита в сыворотке и плазме крови человека.	«
10	Клещевой энцефалит (ТВЕ), IgG, количеств. опред. (ИФА)	Euroimmun AG, Гер- мания (ЗАО «Анали- тика»)
11	Клещевой энцефалит (ТВЕ), IgG, опр. авидности (ИФА)	«
12	Клещевой энцефалит (ТВЕ), IgM, полуколичеств. опред. (ИФА)	«
13	Клещевой энцефалит (ТВЕ), IgG, колич., контроль иммунизации, калибровка в единицах «Vienna» (ИФА, определение в сыворотке/ликворе)	Euroimmun AG, Гер- мания (ЗАО «Анали- тика»)
14	Клещевой энцефалит (ТВЕ), IgG в ликворе, количеств. опред. (ИФА)	«
15	Клещевой энцефалит (ТВЕ), IgM в ликворе, количеств. опред. (ИФА)	«
16	Вирус клещевого энцефалита // Anti-ТВЕ virus IFT, IgG (Непрямой МФА)	«
17	Вирус клещевого энцефалита // Anti-ТВЕ virus IFT, IgM (Непрямой МФА)	«
18	Вирус клещевого энцефалита / вирус Западного Нила / вирус японского энцефалита / вирус желтой лихорадки (Мозаика Флавivirus 1), IgG (Непрямой МФА)	«

№ № п/п	Наименование препарата	Разработчик
19	Вирус клещевого энцефалита / вирус Западного Нила / вирус японского энцефалита / вирус желтой лихорадки (Мозаика Флавирус 1), IgM (Непрямой МФА)	«
20	Вирус клещевого энцефалита / вирус Западного Нила / вирус японского энцефалита / вирус желтой лихорадки / вирус Денге (типы 1-4) (Мозаика Флавивирус 2), IgG (Непрямой МФА)	«
21	Вирус клещевого энцефалита / вирус Западного Нила / вирус японского энцефалита / вирус желтой лихорадки / вирус Денге (типы 1-4) (Мозаика Флави-вирус 2), IgM (Непрямой МФА)	«
<b>ЛИХОРАДКА ДЕНГЕ</b>		
1	Набор реагентов для выявления РНК вирусов Денге (I-IV типов) методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции с электрофоретическим учетом результатов (ГенДенге-РЭФ)	ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора
2	ВирусДенгеИФА (IgG) Anti-Dengue virus ELISA (IgG)	Euroimmun AG, Германия (ЗАО «Аналитика»)
3	ВирусДенгеИФА (IgM) Anti-Dengue virus ELISA (IgM)	
4	Вирус Денге (типы 1-4) (Мозаика), IgG	«
5	Вирус Денге (типы 1-4) (Мозаика), IgM	«
6	SD BIOLINE ВирусДенге IgG/IgM SD BIOLINE Dengue IgG/IgM	Standard Diagnostics, Корея (ЗАО «Аналитика»)
7	SD BIOLINE Вирус Денге антиген NS1 SD BIOLINE Dengue NS1 Ag	«
8	SD BIOLINE Вирус Денге двойной тест (NS1 Ag и IgG/IgM)  SD BIOLINE Dengue Duo (NS1 Ag and IgG/IgM)	«

№ № п/п	Наименование препарата	Разработчик
9	Вирус клещевого энцефалита / вирус Западного Нила / вирус японского энцефалита / вирус желтой лихорадки / вирус Денге (типы 1-4) (Мозаика Флавивирус 2)	Euroimmun AG, Германия (ЗАО «Аналитика»)
<b>ЖЕЛТАЯ ЛИХОРАДКА</b>		
1	Вирус желтой лихорадки, IgG	Euroimmun AG, Германия (ЗАО «Аналитика»)
2	Антитела IgM к вирусу желтой лихорадки, ИИТ	«
3	Вирус клещевого энцефалита / вирус Западного Нила / вирус японского энцефалита / вирус желтой лихорадки (Мозаика Флавивирус 1), IgG	«
4	Вирус клещевого энцефалита / вирус Западного Нила / вирус японского энцефалита / вирус желтой лихорадки (Мозаика Флавивирус 1), IgG	«
5	Вирус клещевого энцефалита / вирус Западного Нила / вирус японского энцефалита / вирус желтой лихорадки (Мозаика Флавивирус 1), IgM	«
<b>ЯПОНСКИЙ ЭНЦЕФАЛИТ</b>		
1	Вирус клещевого энцефалита / вирус Западного Нила / вирус японского энцефалита / вирус желтой лихорадки (Мозаика Флавивирус 1), IgG	Euroimmun AG, Германия (ЗАО «Аналитика»)
2	Вирус клещевого энцефалита / вирус Западного Нила / вирус японского энцефалита / вирус желтой лихорадки (Мозаика Флавивирус 1), IgG	«
3	Вирус клещевого энцефалита / вирус Западного Нила / вирус японского энцефалита / вирус желтой лихорадки (Мозаика Флавивирус 1), IgM	«
<b>ГЕМОРРАГИЧЕСКАЯ ЛИХОРАДКА С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ</b>		

№ № п/п	Наименование препарата	Разработчик
1	Тест-система иммуноферментная для определения антигенов Хантавирусов «Хантагност»	ФГУП «Предприятие по производству бактериальных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН»
2	Диагностикум геморрагической лихорадки с почечным синдромом культуральный поливалентный для непрямого метода иммунофлюоресценции	«
3	Набор реагентов «ИФА-ГЛПС-Пуумала-IgM» Тест-система иммуноферментная для выявления антител класса М к Хантавирусу серотипа Пуумала, возбудителю геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС)	ФГУП «НПО «Микроген» Минздравсоцразвития России
4	ВектоХанта-IgG Набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к хантавирусам (штаммов Хантаан и Пуумала) в сыворотке (плазме) крови человека	ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»» Роспотребнадзора
5	ВектоХанта-IgM Набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса М к хантавирусам (штаммов Хантаан и Пуумала) в сыворотке (плазме) крови человека	«
6	Хантавирус (пул) IgM и IgG	Euroimmun AG, Германия (ЗАО «Аналитика»)
<b>ТЯЖЕЛЫЙ ОСТРЫЙ РЕСПИРАТОРНЫЙ СИНДРОМ (ТОРС)</b>		

№ № п/п	Наименование препарата	Разработчик
1	Набор реагентов для выявления РНК SARS-Coronavirus, вызывающего тяжелый острый респираторный синдром, в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле «АмплиСенс® SARS-Coronavirus-EPh»	ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, ООО «ИнтерЛабСервис»
2	Тест-система иммуноферментная для выявления антител к коронавирусу, ассоциированному с атипичной пневмонией в сыворотке и плазме крови человека (ДС-ИФА- анти-SARS-CoV)	ООО «НПО «Диагностические системы»
3	«Anti- SARS Coronavirus IIFT (IgA)» (НепрямойМФА)	Euroimmun AG, Германия (ЗАО «Аналитика»)
4	«Anti- SARS Coronavirus IIFT (IgM)» (НепрямойМФА)	«
5	«Anti- SARS Coronavirus IIFT (IgG)» (НепрямойМФА)	«
<b>ГРИПП, ВЫЗВАННЫЙ ВИРУСАМИ А (H5N1) и А (H1N1)</b>		
1	Набор реагентов для выявления РНК вируса гриппа А (Influenza virus A) и идентификации субтипа H5N1 в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® Influenza virus A H5N1-FL» (Выпускается в двух вариантах: FER и FRT)	ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, ООО «ИнтерЛабСервис»
2	Набор реагентов для идентификации вируса гриппа свиней А/Н1 методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно- флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® Influenza virus A/ H1-swine-FL» (Выпускается в двух вариантах: FER и FRT)	«

№ № п/п	Наименование препарата	Разработчик
3	Набор реагентов для выявления РНК вирусов пандемического гриппа А(Н1N1), подобных штамму А/California/4/2009 («свиной грипп»), методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции «ПАН Н1N1»	ООО «НПО «ДНК-технология»
4	«Вирус гриппа (антиген), тип А, тип В и тип А(Н1N1) пандемический, раздельное определение» Иммунохроматографический экспресс-тест для качественного раздельного определения антигенов вируса гриппа типа А, типа В и типа А (Н1N1) пандемического непосредственно в образцах назальных, назофарингеальных мазков или мазков из зева, а также в назальных и назофарингеальных аспиратах.	Standard Diagnostics, Корея(ЗАО «Аналитика»)
5	«Вирус гриппа (антиген), тип А(Н1N1) пандемический» (Иммунохроматографический экспресс-тест для качественного определения антигена вируса гриппа типа А (Н1N1) пандемического непосредственно в образцах назальных, назофарингеальных мазков или мазков из зева, а также в назальных и назофарингеальных аспиратах.)	Standard Diagnostics, Корея (ЗАО «Аналитика»)
6	Сыворотки диагностические для идентификации вирусов гриппа А (H5N1), F(Hsw1N1) для РТГА, сухие	ООО «ППДП»
7	Диагностикумы гриппозные типа А (H5N1), А(Hsw1N1) для РТГА, сухие	«
8	Иммуноглобулины диагностические флюоресцирующие сухие для ранней дифференциальной диагностики гриппа А, А (H5), А (H1N1)	«

№ № п/п	Наименование препарата	Разработчик
9	*Набор реагентов для выявления возбудителей острых респираторных вирусных инфекций человека (ОРВИ) РНК респираторно-синцитиального вируса (human Respiratory Syncytial virus - hRSv), метапневмовируса (human Metapneumovirus-hMpv), вирусов парагриппа 1, 2, 3 и 4 типов (human Parainfluenza virus-1-4-hPiv), коронавирусов (human Coronavirus - hCov), риновирусов (human Rhinovirus -hRv), ДНК аденовирусов групп В, С и Е (human Adenovirus В,С,Е- hAdv) и бокавируса (human Bocavirus - hBov) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. «АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL»	ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, ООО «ИнтерЛабСервис»
<b>ОСТРЫЙ ПОЛИОМИЕЛИТ</b>		
1	Набор реагентов для выявления РНК полиовирусов и энтеровирусов группы С (HEV-С) с дифференцировкой вакцинных штаммов полиовирусов (Sabin1, Sabin2, Sabin3) в объектах окружающей среды и клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® Poliovirus-FL»	ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, ООО «ИнтерЛабСервис»
2	Набор реагентов для выявления РНК энтеровирусов (Enterovirus) в объектах окружающей среды и клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® Enterovirus-FL» (Выпускается в двух вариантах: FER и FRT)	«

№ № п/п	Наименование препарата	Разработчик
3	Набор реагентов для выявления РНК энтеровирусов (Enterovirus) в объектах окружающей среды и клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле «АмплиСенс® Enterovirus-EPh»	«
4	Набор реагентов «Сыворотки диагностические энтеровирусные моновалентные сухие для реакции нейтрализации»: «СДЭм» к вирусам полиомиелита типов 1,2,3; «СДЭм» к вирусам Коксаки А 2,4,7,9,10; «СДЭм» к вирусам Коксаки В 1,2,3,4,5,6; «СДЭм» к вирусам ЕСНО 2,3,4,5,6,7,8,9,11,12,13, 16,20,21,25,27,27,29,30,33; «СДЭм» к вирусам Энтеро 68,69,70,71.	ФГУП «Предприятие по производству бактерийных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН»
<b>ЛЕГИОНЕЛЛЕЗ (БОЛЕЗНЬ ЛЕГИОНЕРОВ)</b>		
1	Набор реагентов для выявления ДНК <i>Legionella pneumophila</i> в биологическом материале и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® <i>Legionella pneumophila</i> -FL»	ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, ООО «ИнтерЛабСервис»
2	Набор реагентов для обнаружения и количественного анализа ДНК <i>Legionella pneumophila</i> и <i>Legionella</i> spp. «АмплиЛег-РВ»	ЗАО «Синтол»
3	Экспресс-тест для идентификации <i>Legionella pneumophila</i> - Duopath® <i>Legionella</i>	«Merck KGaA», Германия
4	Антитела к легионелла пневмофила (БИОЧИП Сиквенс) // ВІОСНІР Sequence ІFT, ІgА/Г/М (НРИФ)	Euroimmun AG, Германия (ЗАО «Аналитика»)
5	Антитела к легионелла пневмофила (смеси серотипов 1/2/3/4) // Screening ІFT, ІgА/Г/М (НРИФ)	«

№ № п/п	Наименование препарата	Разработчик
6	<i>Legionella pneumophila</i> , IgA, полуколич. опред. (ИФА)	«
7	<i>Legionella pneumophila</i> , IgG, полуколич. опред. (ИФА)	«
8	<i>Legionella pneumophila</i> , IgM, полуколич. опред. (ИФА)	«
9	ПЦР-тест-система для выявления <i>Legionella pneumophila</i> «Lpn»	ООО «Лаборатория Изоген»
10	Набор реагентов для быстрой идентификации <i>L.pneumophila</i> в реакции латекс-агглютинации, жидкого (Латексная тест-система <i>L.pneumophila</i> серотип 1)	ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспо-требнадзора
<b>ПСЕВДОТУБЕРКУЛЕЗ (ЭКСТРАИНТЕСТИНАЛЬНЫЙ ИЕРСИНИОЗ)</b>		
1	Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие псевдотуберкулезные адсорбированные лошадиные, лиофилизат для диагностических целей	ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора
2	Тест-системы для иммуноблотинга « <i>Yersinia enterocolitica</i> (virulence factors) Anti- <i>Yersinia enterocolitica</i> (IgG) WEST-ERNBLOT Анти- <i>Yersinia enterocolitica</i> (IgA) WEST-ERNBLOT	EUROIMMUN, Германия (ЗАО «Аналитика»)
<b>ЛЕПТОСПИРОЗ</b>		
1	Тест SD BIOLINE <i>Leptospira</i> IgG/IgM	Standard Diagnostics, Корея (ЗАО «Аналитика»)
2	*АмплиСенс® <i>Leptospira</i> -FL	
3	*Набор реагентов для выявления и дифференциации ДНК вирулентных и авирулентных штаммов <i>Yersinia enterocolitica</i> и штаммов <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> в объектах окружающей среды и клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® <i>Yersinia enterocolitica</i> / <i>pseudotuberculosis</i> -FL»	ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, ООО «ИнтерЛабСервис»

№ № п/п	Наименование препарата	Разработчик
<b>ЭНТЕРОГЕМОРАГИЧЕСКАЯ ИНФЕКЦИЯ, вызванная <i>Escherichia coli</i></b>		
1	Сыворотки диагностические, эшерихиозные, групповые и факторные, адсорбированные сухие для РА	ОАО «Биомед» им. И.И. Мечникова
2	RIDA Quick Веротоксин / <i>E.coli</i> O157, экспресс-тест, отдельное опред. В кале	R-Biopharm AG, Германия (ЗАО «Аналитика»)
3	Набор реагентов для выявления специфических ДНК маркеров <i>E.coli</i> O104:H4 методом ПЦР (Тест-система ТЭК-О104)	ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора
4	Набор реагентов для выявления участков ДНК энтерогеморрагических <i>E.coli</i> O157 методом ПЦР (Тест-система ТЭК-О157)	ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора
5	Набор реагентов для быстрой идентификации возбудителя геморрагического колита <i>E.coli</i> O157:H7 в реакции латекс-агглютинации (Латексная тест-система <i>E.coli</i> O157:H7)	ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора
6	Набор реагентов для быстрой идентификации шигатоксинпродуцирующего штамма <i>E.coli</i> O104:H4 в реакции латекс-агглютинации (Латексная тест-система <i>E.coli</i> O104:H4)	ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора
<b>МАЛЯРИЯ</b>		
1	Малярия Комби // Hexagon Malaria Combi, экспресс-тест	Human GmbH, Германия (ЗАО «Аналитика»)
<b>МЕНИНГОКОККОВАЯ ИНФЕКЦИЯ</b>		
1	*Набор реагентов для выявления ДНК <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> и <i>Streptococcus pneumoniae</i> в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® <i>N. meningitidis</i> / <i>H. influenzae</i> / <i>S. pneumoniae</i> -FL»	ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, ООО «ИнтерЛабСервис»

## ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ ИНСТРУКТИВНО-МЕТОДИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ:

1. СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». – 2021. – 1092 с.
2. Специфическая индикация патогенных биологических агентов: практическое руководство / Под ред. акад. РАН Г.Г. Онищенко, акад. РАН В.В. Кутырева. – 2-е изд., переработанное и дополненное. ООО «Буква», 2014. – 284 с.
3. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство // Под ред. Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырева. – М., 2009. – 472 с.
4. МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности». – М., 2009. – 42 с.
5. Методические рекомендации МР 4.2.0089 – 14. Использование метода времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS) для индикации и идентификации возбудителей I-II групп патогенности. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2015. – 19 с.
6. МУК 4.2.3745-22 «Методы лабораторной диагностики холеры».
7. Методические указания МУК 4.2.2413–08 «Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы». – М., 2008.
8. Порядок организации и проведения лабораторной диагностики чумы для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней: МУК 4.2.2940-11– Москва, 2011. – 48с.
9. Дополнения и изменения 1 к МУК 4.2.2940–11: МУК 4.2.3398–16. – Москва, 2017. – 10с.
10. Организация и проведение эпидемиологического надзора в природных очагах чумы на территории Российской Федерации: Методические указания: МУ 3.1.2355-08. – Москва, 2009. – 103 с.
11. МР 3.1.0322-23 «Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих в природных очагах инфекционных болезней». – М., 2023.
12. Методические указания МУ 3.1.2007-05. 3.1. Профилактика инфекционных болезней. Эпидемиологический надзор за туляреми-

ей. – М., 2005. – 34 с.

13. Методические указания МУК 4.2.2939-11. Порядок организации и проведения лабораторной диагностики туляремии для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней: Методические указания. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. – 2012. – 59 с.

14. МУК 4.2.3010-12 «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики бруцеллеза для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней».

15. МУК 3.1.7.3402-16 «Эпидемиологический надзор и лабораторная диагностика бруцеллеза».

16. МУ 3.4.3008-12 «Порядок эпидемиологической и лабораторной диагностики особо опасных, «новых» и «возвращающихся» инфекционных болезней».

17. Учебное пособие к практическим занятиям по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии (общая часть) / Н.С. Хиштова. – Майкоп: ОАО «Полиграфиздат» «Адыгея», 2008. – 108 с.

18. Микробиология, вирусология, иммунология: практикум для стоматологического факультета / Т. А. Канашкова [и др.]. – 3-е изд. – Минск: БГМУ, 2019. – 104 с.

19. МР 3.1.0129-18 Порядок организации и проведения индикации патогенных биологических агентов, в том числе неустановленного систематического положения: Методические рекомендации. – М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2019. – 62 с.

20. Приказ Роспотребнадзора от 1 декабря 2017 года № 1116 «О совершенствовании системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации».

Подписано в печать 05.09.2025.  
Формат 60x84/16. Усл.п.л. 9,375. Тираж 100 экз. Заказ № 4903.

Отпечатано: ИП Копыльцов П.И. 394052, Россия, г. Воронеж,  
ул. Маршала Неделина, д. 27, кв. 56. Тел.: 8 (950) 765 69 59