

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ  
ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА  
Федеральное казённое учреждение здравоохранения  
«Иркутский ордена Трудового Красного Знамени  
научно-исследовательский противочумный  
институт Сибири и Дальнего Востока»

# **РУКОВОДСТВО К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ ПО ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ**



УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ

ИРКУТСК – 2022



Федеральная служба по надзору в сфере защиты  
прав потребителей и благополучия человека  
Федеральное казенное учреждение здравоохранения  
«Иркутский ордена Трудового Красного Знамени  
научно-исследовательский противочумный институт  
Сибири и Дальнего Востока»

**РУКОВОДСТВО  
К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ  
ПО ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ  
СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ**  
(учебно-методические пособия)

Иркутск – 2022

УДК 616.993-071

ББК 53.4:55.146

P85

**Руководство** к практическим занятиям по лабораторной диагностике сибирской язвы: учебно-методическое пособие. – Иркутск: ИНЦХТ, 2022 – 56 с.

ISBN 978-5-98277-352-4

Утверждено Ученым советом  
ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский  
противочумный институт Роспотребнадзора»

Предлагаемое учебно-методическое пособие предназначено для организации и проведения практических занятий на курсах профессиональной переподготовки и повышения квалификации врачей, биологов и лаборантов по особо опасным инфекциям, включает традиционные и современные методы лабораторной диагностики сибирской язвы. Оно поможет освоить теоретический материал, методически правильно выполнять задания, надлежащим образом организовать материальную базу и рационально использовать время при проведении каждого занятия.

Авторы:

*О.Б. Колесникова, Т.Ю. Загоскина, Т.М. Долгова, О.В. Гаврилова,  
О.А. Старикова, З.Ф. Дугаржапова, Е.В. Кравец, С.В. Балахонов*

ISBN 978-5-98277-352-4



© Коллектив авторов, 2011, 2019, 2022

© ИНЦХТ, 2022

## СОДЕРЖАНИЕ

Аннотация .....	4
I. Основные биологические свойства возбудителя сибирской язвы .....	5
Занятие 1 .....	11
Занятие 2 .....	12
Занятие 3 .....	14
II. Лабораторный диагноз .....	15
Занятие 4 .....	20
Занятие 5 .....	21
Занятие 6 .....	23
Занятие 7 .....	25
Занятие 8 .....	26
Занятие 9 .....	32
Занятие 10 .....	33
Выдача заключений по результатам лабораторного исследования на сибирскую язву .....	34
Приложения .....	36
1. Режим работы с бактериями, образующими споры .....	36
2. Питательные среды, применяемые для изучения возбудителя сибирской язвы .....	40
3. Методики изучения биологических свойств возбудителя сибирской язвы .....	41
4. Паспорт штамма .....	50
Список сокращений .....	52
Контрольные вопросы для подготовки к практическим занятиям .....	53
Список использованной литературы .....	54

## АННОТАЦИЯ

Предлагаемое учебно-методическое пособие составлено в помощь преподавателям и специалистам, обучающимся по программам дополнительного профессионального образования «Бактериология. Основы безопасной работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) I–II групп», «Эпидемиология. Основы безопасной работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) I–II групп» и «Лабораторное дело. Особо опасные инфекции».

Пособие предназначено для лиц с медицинским, биологическим или ветеринарным образованием, работающих в противочумных учреждениях, отделах особо опасных инфекций ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора, а также учреждениях других министерств и ведомств по специальностям «Бактериология», «Эпидемиология» и «Лабораторное дело».

Оно поможет освоить теоретический материал, методически правильно выполнять задания, надлежащим образом организовать материальную базу и рационально использовать время при проведении каждого занятия.

Материал рассчитан на 32 учебных часа и распределен на 10 практических занятий. Теоретический и практический курс освещает основные биологические свойства возбудителя сибирской язвы, микробиологические, серологические и молекулярно-генетические методы лабораторной диагностики. Учебное пособие содержит 6 рисунков и 6 таблиц. Каждое практическое занятие включает план, методические указания к выполнению заданий и перечень необходимых материалов и оборудования.

В приложении освещены вопросы безопасности работы со спорообразующими микроорганизмами, рецептуры сред, методики изучения биологических свойств возбудителя сибирской язвы, образец паспорта штамма, выделенного из исследуемого материала, списки использованных сокращений и литературных источников.

Сибирская язва является острым инфекционным заболеванием животных (домашних и диких) и человека, относится к группе особо опасных инфекций. Согласно классификации биологических агентов, вызывающих болезни человека, сибиреязвенный микроб относится к бактериям II группы патогенности (СанПиН 3.3686-21 приложение 1).

Основным источником инфекции при сибирской язве являются больные этим заболеванием травоядные животные. Они в течение всего периода болезни выделяют возбудителя с мочой, испражнениями и слюной в почву, инфицируя ее, поэтому почва, особенно богатая органическими веществами, становится дополнительным резервуаром возбудителя. Заражение животных происходит, главным образом, алиментарным (через корм и питьевую воду, зараженными спорами), реже – трансмиссивным (через укусы кровососущих насекомых) и воздушным путями.

Заражение человека сибирской язвой происходит при непосредственном контакте с больными животными или их трупами: разделке туш вынужденно убитых животных, уходе за больными животными, употреблении мяса или мясных продуктов, работе с шерстью, шкурами, кожей, щетиной, полученных от больных животных.

## **I. ОСНОВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ**

Возбудитель сибирской язвы – *Bacillus anthracis* – относится к семейству *Bacillaceae*, роду *Bacillus*. Этот род объединяет около 25 аэробных или факультативно-анаэробных бактерий, в том числе *B. cereus*, *B. mesentericus*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis* и др. В зависимости от стадии развития культуры, а также условий внешней среды, возбудитель сибирской язвы может существовать в трех формах: в виде бескапсульных палочек, инкапсулированных палочек и в споровой форме. Сибиреязвенная бацилла – это крупная грамположительная палочка длиной 5–8, иногда до 10 мкм, диаметром 1,0–1,5 мкм. Концы палочек слегка закруглены, или как бы обрублены и слегка вогнуты. Сибиреязвенные клетки в мазках располагаются цепочками разной длины, напоминая визуально «бамбуковую трость», хорошо красятся

всеми анилиновыми красителями. Вирулентные штаммы возбудителя сибирской язвы в анаэробных условиях образуют капсулу (рис. 1), но только в организме животного и человека или на специальных питательных средах. Капсулообразование патогенных бактерий – защитный механизм от фагоцитоза в макроорганизме. Утрата капсулы ведет к резкому снижению вирулентности возбудителя сибирской язвы.



**Рис. 1.** Капсула *Bacillus anthracis*.

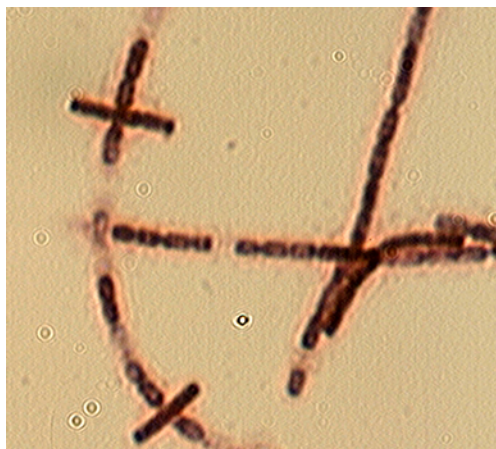
Спорообразование у *B. anthracis* не является способом размножения. Образование спор происходит в случаях, когда бактерии испытывают дефицит источников энергии, – только вне организма человека или животного при наличии кислорода и определенной влажности. При попадании спор в благоприятные условия (оптимальные влажность, аэрация, температура, питательные вещества и т.д.) из них уже через 18–20 часов образуются вегетативные клетки. Споры располагаются в теле бактерий центрально (в каждой клетке только одна), их диаметр не превышает диаметра клетки (рис. 2.) Поскольку в крови и тканях животных и человека источники питания бактерий имеются, спорообразования в организме не происходит.

Возбудитель сибирской язвы – аэроб или факультативный анаэроб. Температурный оптимум для роста 37–38 °С, рН среды 7,2–7,6. К питательным средам не требователен.

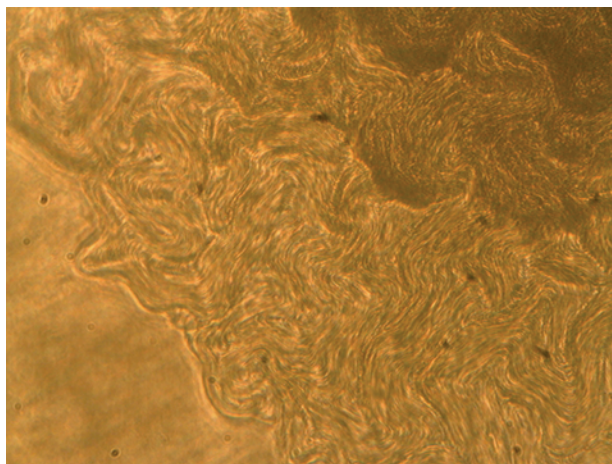
На плотных средах образует характерные крупные матовые шероховатые (R) колонии. По структуре колонии, благодаря цепочечному



расположению палочек, образуют нити, отходящие от центра – напоминают «львиную гриву» (рис. 3).



**Рис. 2.** Спора в клетке *Bacillus anthracis*.



**Рис. 3.** Морфология края колонии *Bacillus anthracis*.

В бульоне бациллы в R-форме образуют придонный осадок в виде комочка ваты, бульон при этом остается прозрачным. Одним из культурально-морфологических свойств, являющимся наиболее постоянным для сибиреязвенного микроба, считают отсутствие

у него жгутиков, а, следовательно – подвижности, – в отличие от споровых сапрофитных аэробов, что можно определить путем высева культуры уколом в столбик 0,3%-го полужидкого агара.

На дифференциально-диагностических средах с содержанием 0,01 % фенолфталейнфосфата натрия отсутствие фосфатазной активности у *B. anthracis* позволяет дифференцировать его от близкородственных микроорганизмов.

Большинство типичных сибиреязвенных штаммов проявляют высокую чувствительность к широко известным антибиотикам – пенициллинам, цефалоспорином, тетрациклинам и т.д. Пенициллин способен задерживать развитие сибиреязвенного микроба даже при слабой концентрации в питательной среде. На агаре и в бульоне, содержащих пенициллин (0,05–0,5 ЕД/мл), через 3 ч инкубации бациллы образуют цепочки из шарообразных клеток – феномен «жемчужного ожерелья» (рис. 4). Сибиреязвенный микроб обладает устойчивостью к полимиксину, что является видовым признаком и используется в качестве критерия при выделении возбудителя из внешней среды.



Рис. 4. «Жемчужное ожерелье».

Основные свойства, определяющие выделение сибиреязвенного микроба в отдельную систематическую единицу и обуславливающие патогенез заболевания, заключаются в его факторах патогенности: способности клетки синтезировать сложнoкомпонентный экзотоксин и капсулу – полипептид d-глутаминовой кислоты. Гены, кодирующие

синтез экзотоксина и капсулы, локализованы на плаزمидах рХО1 и рХО2 м.м. 110 и 60 мДа, соответственно. Геном типичного штамма сибиреязвенного микроба представлен одной кольцевой хромосомой и двумя плазмидами. У близкородственных бацилл эти плазмиды не обнаружены. Токсин, секретлируемый *B. anthracis*, специфика действия которого определяет клиническое течение болезни и проявляется на ранних этапах патологического процесса, состоит из трех белковых компонентов, биологическая активность которых проявляется при их сочетанном действии. Согласно принятой классификации, компоненты токсина обозначаются как отечный фактор (ОФ), протективный антиген (ПА) и летальный фактор (ЛФ). Установлено, что ОФ является аденилатциклазой (цАТФ пиррофосфатлиаза), ответственной за многократное повышение уровня цАМФ. Бактериальная клетка продуцирует фермент в неактивной форме, а его активация в клетках макроорганизма происходит под воздействием Са-связывающего белка – кальмодулина. Роль ПА заключается в создании рецепторной системы, через которую в клетку макроорганизма проникают ОФ и ЛФ. Кроме того, ПА способствует выработке в организме восприимчивого животного и человека специфических иммуноглобулинов, т.е. участвует в формировании антитоксического иммунитета. ЛФ проявляет цитотоксический эффект и вызывает отек легких.

Каждый из компонентов в отдельности не обладает патогенными свойствами. Для полного проявления биологической активности токсина необходимы все три компонента.

Генетические детерминанты факторов патогенности *B. anthracis* изучены путем клонирования генов отечного, протективного, летального компонентов токсина и гена капсулы, определения их нуклеотидных последовательностей, создания моделей возможных механизмов их регуляции. Наиболее распространенными подходами к генетическому типированию штаммов сибиреязвенного микроба, на сегодняшний день, являются определение плазмидного профиля методом ПЦР, мультилокусный анализ областей генома с переменным числом tandemных повторов (MLVA) и др., которые в преимущественном большинстве случаев позволяют установить различия между вирулентными штаммами, несущими гены факторов патогенности, и штаммами со сниженной вирулентностью, частично или полностью утратившими детерминанты факторов патогенности. Так скрининг плазмидных ДНК сибиреязвенных штаммов позволяет разделить их на четыре группы: имеющие обе

плазмиды (типичные вирулентные штаммы), имеющие плазмиду рХО1 (вакцинные штаммы, например, СТИ-1, 34F<sub>2</sub>, Ихтиман и др.), имеющие плазмиду рХО2 и лишённые обеих плазмид.

Кроме возбудителя сибирской язвы, токсинообразующей способностью обладают *B. cereus*, продуцирующий растворимый диаррогенно-летальный токсин. Токсин при парентеральном введении обеспечивает гибель в течение 5–30 мин мышей, крыс, кроликов, а у людей может вызывать пищевую токсикоинфекцию, кератит, эндофтальмит, панофтальмит, эндокардит, менингит, остеомиелит, пневмонию.

Существует ряд отличительных признаков, позволяющих дифференцировать *B. anthracis* от близкородственных микроорганизмов: наличие плазмид вирулентности, капсулообразование, специфическое свечение при исследовании методом флуоресцирующих антител, лизис культуры под действием специфических сибирез-венных бактериофагов, положительная проба с пенициллином (тест «жемчужное ожерелье»), отсутствие гемолитической, фосфатазной и лецитиназной активности.

Дифференциальные признаки *B. anthracis* и *B. cereus* (типичные штаммы СТИ и 504 Т, соответственно) приведены ниже (табл. 1). Наличие трех положительных тестов, в числе которых один из признаков патогенности, дает возможность отнести культуру к возбудителю сибирской язвы.

Таблица 1

**Дифференциальные признаки *B. anthracis* и *B. cereus***

Вид микроба	Рост на агаре	Рост в бульоне	Подвижность	Наличие капсулы	Гемолиз	Протеолитическая активность	Лецитиназная активность	Фосфатазная активность	Пенициллиназная активность	Феномен «жемчужного ожерелья»	Лизис сибирез-венным фагом	Патогенность для лаб. животных	Специфическое люом. свечение	Плазмиды вирулентности
<i>B. anthracis</i>	край колонии в виде «львиной гривы»	бульон прозрачный осадок на дне в виде «комка ваты»	–	+	±	±	±	±	–	+	+	+	+	+
<i>B. cereus</i>	край колонии волнистый	бульон мутный, разбивающийся осадок	+	–	+	+	+	+	+	–	–	±	–	–

**Примечание.** «+» – положительный признак; «–» – отрицательный признак; «±» – в редких случаях, в поздние сроки (3–4 сут) выращивания.

## ЗАНЯТИЕ 1 (2 Ч)

### БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА *B. ANTHRACIS* И *B. CEREUS*

#### 1. Изучение морфологических, культуральных и биохимических свойств

1.1. Изучить характер роста культур на скошенном мясопептонном агаре.

1.2. Изучить морфологию микробов в мазках, окрашенных по Граму.

1.3. Посеять 24-часовые агаровые культуры в мясопептонный бульон, 0,3%-й полужидкий агар, 10–12%-й желатин, на капсулообразующую среду ГКИ (приложение 2.2), на две чашки МПА, чашку МПА с желтком (приложение 2.1), чашку МПА с фенолфталеинфосфатом натрия (приложение 2.3); чашку МПА с 5 % крови барана (приложение 2.4).

#### Примечание:

- а) посевы в желатине и 0,3%-м ПЖА поставить при комнатной температуре;
- б) посев на капсулообразующей среде поместить в эксикатор или CO<sub>2</sub>-инкубатор и выращивать при 37 °С в течение 24 ч (приложение 3.13);
- в) остальные посевы поместить при 37 °С;
- г) произвести записи в журналах: учета ПБА, находящихся в рабочей коллекции; движения культур.
- д) см. прил. 1, 2.

#### Материал и оборудование

24-часовые культуры <i>B. anthracis</i> и <i>B. cereus</i> на скошенном МПА рН 7,2–7,6	по 1 пробирке
МПА рН 7,2–7,6	4 чашки
Среда ГКИ	2 пробирки
МПА с 0,01%-м ФФФ	2 чашки
МПА с 5 % крови барана	2 чашки
МПБ по 4,5 мл	2 пробирки
МПА с желтком	2 чашки
Желатин (10–12%-й)	2 пробирки
0,3%-й ПЖА	2 пробирки
0,9%-й раствор хлористого натрия	5 мл

Бикарбонат натрия .....	5 г
Фиксатор: 96%-й этиловый спирт, содержащий 3 % $H_2O_2$ .....	200 мл
6%-й раствор $H_2O_2$ , содержащий 0,5 % моющего средства .....	3 л
Предметные стекла .....	2 шт.
Эксикатор объемом 5 л или $CO_2$ -инкубатор .....	1 шт.
Кристаллизатор для промывания мазков .....	1 шт.
Набор для окрашивания мазков по Граму .....	1 шт.
Иммерсионное масло .....	0,1 мл
Микроскоп световой .....	1 шт.
Термостат на 37 °С .....	1 шт.

## ЗАНЯТИЕ 2 (4 Ч)

### БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА *B. ANTHRACIS* И *B. CEREUS*

#### 1. Изучение морфологических, культуральных и биохимических свойств

1.1. Изучить суточный рост.

- а) просмотреть колонии на МПА, в том числе морфологию колоний под микроскопом;
- б) изучить морфологию роста культур в МПБ.

1.2. Изучить морфологию микроба в мазках, окрашенных по Граму, приготовленных с МПА и МПБ.

1.3. Изучить подвижность в 0,3%-м ПЖА.

1.4. Изучить гемолитическую активность на МПА с 5 % крови барана (приложение 3.8).

1.5. Изучить лецитиназную активность (приложение 3.9) на агаре с желтком.

1.6. Изучить протеолитическую активность и характер роста в 10–12%-м желатине.

1.7. Изучить фосфатазную активность на МПА с ФФФ (приложение 3.10).

1.8. Изучить способность к капсулообразованию (приложение 3.13): из культур, выращенных на капсулообразующей среде (ГКИ) в  $CO_2$ -инкубаторе или эксикаторе, приготовить мазки и окрасить одним из методов: Бурри-Гинса (приложение 3.1), Михина (приложение 3.2) или Ребигера (приложение 3.3).

1.9. Изучить чувствительность к пенициллину:

1.9.1. Посеять стандартной бактериологической петлей суточные бульонные культуры на чашки МПА, содержащие 10 и 50 ЕД/мл пенициллина (приложение 3.11);

1.9.2. Поставить тест «жемчужное ожерелье»:

а) методом Груз (приложение 3.7);

б) методом посева на чашки МПА с пенициллином (0,5 ЕД/мл; 0,05 ЕД/мл) (приложение 3.6). Контролем служит агар без пенициллина.

1.10. Изучить фаголизабельность, используя 3–6-часовую бульонную культуру (приложение 3.5).

**Примечание:**

а) начать работу с посева культур в пробирки с МПБ и МПБ с 0,5 ЕД/мл пенициллина для постановки теста «жемчужное ожерелье»;

б) посевы в желатине оставить при комнатной температуре;

в) подпункты «а, б» пункта 1.9.2 выполнять с 3-часовыми бульонными культурами;

г) заполнить журнал движения культур.

### Материал и оборудование

МПБ .....	2 пробирки
МПБ с 0,5 ЕД/мл пенициллина .....	2 пробирки
МПА рН 7,2–7,6 .....	4 чашки
МПА с 50 ЕД/мл пенициллина .....	2 чашки
МПА с 10 ЕД/мл пенициллина .....	2 чашки
МПА с 0,5 ЕД/мл пенициллина .....	2 чашки
МПА с 0,05 ЕД/мл пенициллина .....	2 чашки
0,9%-й раствор хлористого натрия .....	5 мл
Сибирезывенный бактериофаг .....	0,2 мл
Нашатырный спирт .....	0,5 мл
Синька Леффлера .....	0,5 мл
Тушь .....	0,2 мл
Раствор Ребигера .....	0,5 мл
Предметное стекло .....	8 шт.
Покровное стекло .....	4 шт.
Фиксатор: 96%-й спирт, содержащий 3 % $H_2O_2$ .....	200 мл

Набор для окрашивания мазков по Граму .....	1 шт.
6%-й раствор $H_2O_2$ , содержащий 0,5 % моющего средства .....	3 л
Кристаллизатор для промывания мазков .....	1 шт.
Иммерсионное масло .....	0,05 мл
Микроскоп световой .....	1 шт.
Термостат на 37 °С .....	1 шт.

### ЗАНЯТИЕ 3 (1,5 Ч)

#### БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА *B. ANTHRACIS* И *B. CEREUS*

##### 1. Изучение морфологических, культуральных и биохимических свойств

1.1. Учесть пробу с сибиреязвенным бактериофагом.

1.2. Отметить рост на агаре с пенициллином в концентрации 10 и 50 ЕД/мл.

1.3. Изучить способность к спорообразованию:

а) приготовить мазки из 3-суточных агаровых культур;

б) окрасить мазки по методу Пешкова или другим способом (приложение 3.4).

##### Примечание:

а) результаты изучения культур вписать в таблицу 2.

Таблица 2

Вид микроба	Рост на МПА	Рост в МПБ	Окраска по Граму	Подвижность	Наличие спор	Наличие капсулы	Протеолитическая активность	Пенициллиназная активность	Тест «жемчужное ожерелье»	Гемолитическая активность	Фосфатазная активность	Чувствительность к сибиреязвенному бактериофагу
<i>B. anthracis</i>												
<i>B. cereus</i>												

б) передать все имеющиеся в наличии культуры для обеззараживания;

в) произвести записи в журналах движения культур и учета ПБА, находящихся в рабочей коллекции;



- г) составить акт на уничтожение культуры возбудителя сибирской язвы.

### Материал и оборудование

Фиксатор: 96%-й спирт, содержащий 3 % $H_2O_2$ .....	200 мл
Синька Леффлера .....	0,5 мл
0,5%-й водный раствор нейтрального красного .....	0,5 мл
Предметное стекло .....	2 шт.
Иммерсионное масло .....	0,05 мл
6%-й раствор $H_2O_2$ , содержащий 0,5 % моющего средства .....	3 л
Кристаллизатор для промывания мазков .....	1 шт.
Микроскоп световой .....	1 шт.

## II. ЛАБОРАТОРНЫЙ ДИАГНОЗ

Современная лабораторная диагностика сибирской язвы включает бактериоскопический, бактериологический, биологический, молекулярно-генетический и серологический методы.

Лабораторное исследование при сибирской язве проводят с целью выявления возбудителя, фрагментов ДНК или специфических антигенов от больного человека (содержимое везикул, карбункулов, отделяемое язв, струп, мокрота, кровь), из органов павших животных, кожевенного сырья, шерсти и объектов окружающей среды (почва, вода, смывы и т.д.) (рис. 5).

### Материал для исследования:

- а) от больных или подозрительных на заболевание животных и людей, контактных с больными в эпидочагах, – содержимое везикул и пустул, отделяемое карбункула или язвы, струпы, мокрота, кровь, моча, испражнения, экссудаты, выпоты;
- б) трупный материал – кровь, экссудаты, выпоты, кусочки органов, селезенки, печени, лимфоузлов и др.;
- в) продовольственное сырье и продукты животного происхождения – мясо, мясопродукты, кости и костные фрагменты, шерсть, кожевенное сырье;
- г) объекты внешней среды – почва, трава, фураж, подстилка, вода и т.д.

Материал от больных людей, сырье животного происхождения забирают в стерильные пробирки, банки или другую лабораторную

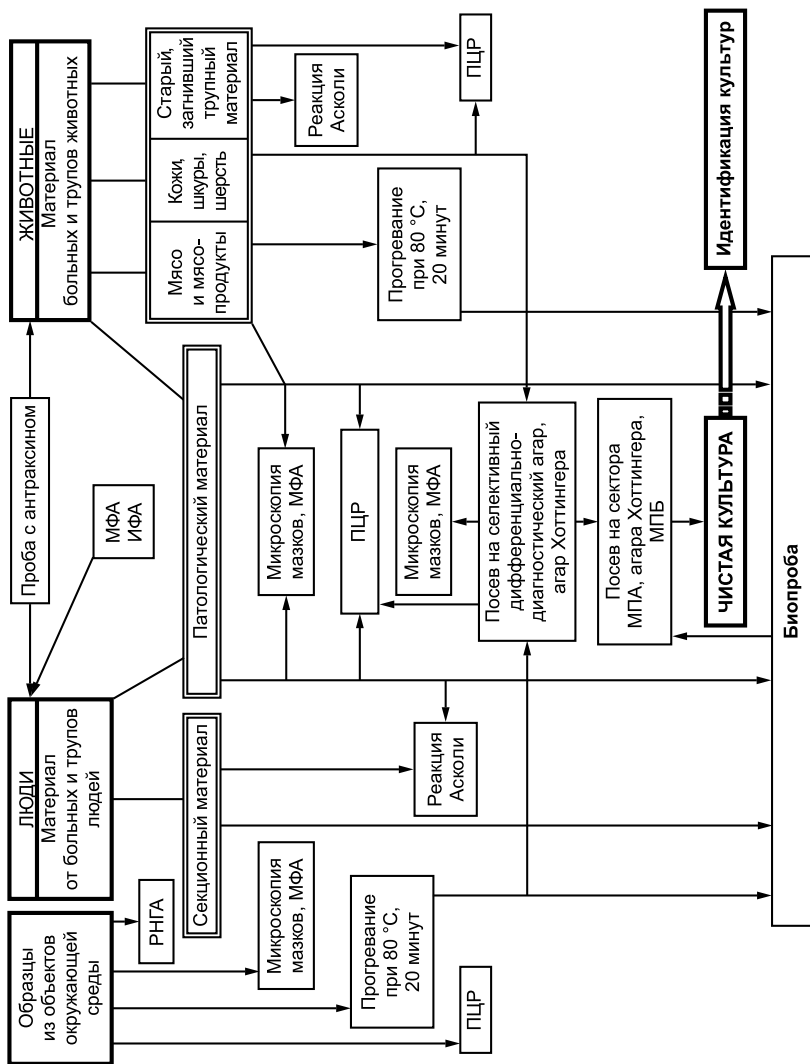


Рис. 5. Общая схема лабораторного исследования на сибирскую язву.

посуду. Кровь для исследования берут из вены в пробирку, засевают в питательную среду и делают два тонких мазка на предметных стеклах.

У трупа павшего животного с соблюдением строжайших мер предосторожности производят отсечение уха с той стороны, на которой оно лежит: ухо крепко перевязывают выше и ниже предполагаемой линии среза, место среза прижигают, отсеченную часть направляют на исследование. Материал заворачивают в пергаментную бумагу и полиэтиленовую пленку, упаковывают в металлическую коробку или ящик.

Почву отбирают в плотные хлопчатобумажные (холщовые) мешочки в количестве 100–200 г на пробу. Особое внимание обращают на костные фрагменты, которые также отбирают и упаковывают.

Воду на исследование направляют в объеме не менее 1 л.

Отбор проб воздуха в количестве 3–5 м<sup>3</sup> производят с помощью приборов – аспираторов (Кротова, Дьяконова, Речменского, Киктенко, каскадных импакторов).

Смывы с объектов окружающей среды рекомендуется брать тампоном, смоченным стерильной дистиллированной водой, и помещать в стерильную посуду с плотно закрывающейся крышкой (пробкой). Площадь смыва составляет около 100 см<sup>2</sup>.

На объекты, подлежащие исследованию, составляют сопроводительный документ (акт отбора) с указанием места, времени, даты отбора и подписи лица взявшего материал. В лабораторию анализы направляют в пломбированных или опечатанных герметичных сумках-холодильниках (биологический материал) или железных ящиках с нарочным.

Из исследуемого субстрата готовят несколько мазков. Окраску производят по Граму (на вегетативные клетки) и Пешкову (на споры). Бактериоскопию сочетают с люминесцентно-серологическим анализом. В мазках споры выявляются в виде овальных или круглых образований, окрашенных в голубой или синий цвет. В мазках от больного или трупа человека и животных возбудитель сибирской язвы определяется в виде характерных крупных палочек, окруженных капсулой (окрашивание по Гинсу). В мазках, окрашенных видоспецифической люминесцирующей сывороткой, свечение на 3–4 креста. По результатам микроскопического исследования немедленно дают предварительный ответ.

Не загрязненный посторонней микрофлорой патологический материал от больного засевают на МПА и в пробирки с МПБ.

Для избавления от посторонней микрофлоры пробы (объекты внешней среды, шерсть, кожа, пищевые продукты) делят на две части, одну из которых подвергают термической обработке на водяной бане при 80 °С в течение 20 мин. Пробы от больного человека, животного, из патологического материала, мяса животных, где возбудитель сибирской язвы находится в вегетативной форме, не прогревают.

Подготовленный для исследования материал (не прогретый и прогретый) засевают на чашки с МПА; МПА, содержащим 5 % дефибринированной крови барана; МПА, содержащим 0,01%-й ФФФ, пробирки с МПБ. Посевы помещают в термостат при температуре 37 °С.

Исследуемым материалом заражают биопробных животных (белых мышей или морских свинок) подкожно или внутрибрюшинно по 0,2–0,5 мл. Наблюдение за подопытными животными длится до 10 дней, если они не пали. Павших животных вскрывают немедленно, производят посевы инфильтрата из места инъекции, крови и органов (сердце, селезенка, печень) на питательные среды, делают мазки, окрашивают их по Граму, одним из методов для выявления капсулы и вегетативной люминесцирующей сывороткой, отмечают патологоанатомические изменения. В положительном случае в мазках обнаруживают вегетативные клетки в виде коротких цепочек, отдельные микробные клетки, окруженные капсулой и специфически светящиеся клетки типичной морфологии в МФА. При вскрытии животных, павших от сибирской язвы, отмечают увеличенную селезенку, гиперемии внутренних органов, не свернувшуюся кровь. На месте введения материала наблюдается различной величины студенистый геморрагический отек. Животных, выживших после 10-дневного срока наблюдения, исследуют в полном объеме.

После 20-часовой инкубации посевов исследуемого материала или органов биопробных животных отбирают колонии для дальнейшей идентификации. В первую очередь исследуют колонии, имеющие морфологию, характерную для возбудителя сибирской язвы. В случае отсутствия «подозрительных» колоний с каждого посева следует отбирать и изучать не менее 10 любых шероховатых колоний. Колонии отсевают на МПА и МПБ. Культуру идентифицируют по основным тестам: наличие генов плазмид вирулентности, проба со специфическим сибиреязвенным фагом, тест на чувствительность к пенициллину, на патогенность для белых мышей и морских

свинок, способность к капсулообразованию, на гемолитическую и фосфатазную активность и дополнительным: лецитиназная активность, чувствительность к антибактериальным препаратам (АБП), дифференциация культур сибиреязвенного микроба по вирулентности *in vitro* и *in vivo*.

У выделенной культуры *B. anthracis* определяют DL для кроликов и LD<sub>50</sub> для морских свинок и белых мышей. По степени вирулентности для белых мышей Э.Н. Шляхов и Е.В. Груз предложили следующее разделение:

- 1) высоковирулентные – LD<sub>50</sub> до 10 спор;
- 2) вирулентные – LD<sub>50</sub> 10–20 спор;
- 3) умеренновирулентные – LD<sub>50</sub> от 20 до 200 спор;
- 4) слабовирулентные – LD<sub>50</sub> более 200 спор;
- 5) авирулентные – LD<sub>50</sub> более  $1 \times 10^4$  спор.

Для сокращения сроков бактериологического анализа предложен ускоренный биологический метод обнаружения возбудителя сибирской язвы. Согласно этому методу, исследуемый материал вводят внутрибрюшинно шести белым мышам по 0,5 мл. Через 1 и 2 ч вскрывают по паре мышей, из перитонеального экссудата и крови сердца делают мазки, из селезенки и печени – мазки-отпечатки. Мазки окрашивают одним из методов на обнаружение капсулы и капсульно-соматической люминесцирующей сибиреязвенной сывороткой. Параллельно производят посевы на питательные среды с целью выделения чистой культуры возбудителя. Оставшуюся пару мышей наблюдают до 10 суток.

Реакцию термореципитации Асколи используют в случаях, когда трудно рассчитывать на выделение чистой культуры возбудителя: при исследовании шерсти, шкур, щетины, войлока, овчины, костной муки и прочих объектов, а также при начавшихся явлениях трупного разложения и т.д. Реакция основана на обнаружении термостабильных антигенов возбудителя, которые сохраняются гораздо дольше, чем жизнеспособные вегетативные клетки. Реакция Асколи позволяет быстро обнаружить сибиреязвенный антиген. Тем не менее, эту реакцию нельзя признать строго специфичной, поскольку полисахаридный антиген возбудителя сибирской язвы вступает в реакцию с преципитирующими сыворотками против близкородственных микроорганизмов (*B. cereus*, *B. subtilis*).

Специфическая индикация возбудителя сибирской язвы проводится методами ПЦР, МФА, РНГА, иммунохроматографии (ИХТ-

полоски), бактериоскопии. Использование данных методов позволяет получить положительный ответ в течение первых суток исследования, но для полного подтверждения необходимо провести полный комплекс основных и дополнительных тестов микробиологической диагностики сибирской язвы.

В настоящее время выпускаются наборы реагентов для обнаружения ДНК возбудителя сибирской язвы с детекцией результатов амплификации методом электрофореза в агарозном геле, по «конечной точке» и в режиме «реального времени». При люминесцентной микроскопии, проводимой с использованием вегетативной или антиспоровой люминесцирующих сывороток, возбудитель обнаруживается в вегетативной или споровой формах. Чувствительность методов высока и колеблется в пределах сотен тысяч микробных клеток в одном миллилитре материала. Результаты во многом зависят от правильной подготовки проб.

## **ЗАНЯТИЕ 4 (2,5 Ч)**

### **ИССЛЕДОВАНИЕ МАТЕРИАЛА ОТ БОЛЬНОГО И ПОЧВЫ НА ОБНАРУЖЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ**

#### **1. Исследование содержимого карбункула больного**

1.1. Приготовить мазки для окраски по Граму и сибиреязвенной люминесцирующей сывороткой (приложение 3.15).

1.2. Посеять исследуемый материал на МПБ и на 2 чашки МПА с целью получения изолированных колоний.

1.3. Поставить пробу на белых мышах (ввести подкожно двум белым мышам по 0,3 мл содержимого карбункула).

#### **2. Исследование почвы**

2.1. Приготовить взвесь почвы в 0,9%-м растворе хлористого натрия (1 : 10).

2.2. Обработать  $\frac{1}{2}$  часть полученной взвеси термическим методом (прогревание на водяной бане при 80 °С в течение 20 мин).

2.3. Посеять обработанную и необработанную почву на МПБ, 2 чашки МПА, 2 чашки 5%-го кровяного агара и 2 чашки МПА с 0,01%-м ФФФ для получения изолированных колоний.

2.4. Поставить биопробу на белых мышах (ввести подкожно двум белым мышам по 0,3 мл суспензии термически обработанной почвы).

**Примечание:** см. рис. 5.

### Материал и оборудование

Содержимое карбункула . . . . .	1 объект
Почва . . . . .	50 г
МПА pH 7,2–7,6 . . . . .	6 чашек
5%-й кровяной агар . . . . .	4 чашки
МПА с 0,01%-м ФФФ . . . . .	4 чашки
Фиксатор: 96%-й спирт, содержащий 3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . . . . .	200 мл
0,9%-й раствор хлористого натрия . . . . .	150 мл
Люминесцирующая сибиреязвенная сыворотка . . . . .	0,2 мл
Глицерин для микроскопии . . . . .	0,2 мл
6%-й раствор H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , содержащий 0,5 % моющего средства . . . . .	3 л
Белая мышь . . . . .	4 шт
Предметное стекло . . . . .	2 шт
Покровное стекло . . . . .	1 шт
Стакан для промывания мазков . . . . .	3 шт
Кристаллизатор для промывания мазков . . . . .	1 шт
Набор для окрашивания мазков по Граму . . . . .	1 шт.
Микроскоп световой . . . . .	1 шт
Люминесцентный микроскоп . . . . .	1 шт
Иммерсионное масло . . . . .	0,05 мл
Нелюминесцирующее иммерсионное масло . . . . .	0,5 мл
Водяная баня на 80 °С . . . . .	1 шт
Термостат на 37 °С . . . . .	1 шт

### ЗАНЯТИЕ 5 (5 Ч)

#### ИССЛЕДОВАНИЕ МАТЕРИАЛА ОТ БОЛЬНОГО И ПОЧВЫ НА ОБНАРУЖЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

- 1. Продолжение исследования содержимого карбункула больного: выделение чистой культуры**
  - 1.1. Просмотреть рост на чашках МПА.
  - 1.2. Отобрать подозрительные колонии, проверить их мазком с окраской по Граму, посеять на сектора чашки с 5%-ным кровяным агаром и в МПБ.

1.3. Вскрыть павших биопробных животных, зараженных содержимым карбункула больного.

- а) описать патологоанатомическую картину, заполнить протокол;
- б) посеять органы (печень, лимфатический узел, селезенку) на чашку МПА, кровь – в МПБ;
- в) приготовить три мазка: по Граму, для МФА, для обнаружения капсулы по Михину (приложение 3.2) или Ребигеру (приложение 3.3).

## 2. Продолжение исследования почвы: выделение чистой культуры

2.1. Просмотреть рост на чашках с посевами нативного материала.

2.2. Отобрать подозрительные колонии под контролем мазка с окраской по Граму.

2.3. Посеять колонии на сектора 5%-го кровяного агара и в МПБ.

2.4. Вскрыть павших биопробных животных, зараженных суспензией обработанной почвы.

- а) описать патологоанатомическую картину, заполнить протокол;
- б) посеять органы (печень, селезенку) и лимфатический узел на чашку с МПА, кровь – в МПБ;
- в) приготовить три мазка: по Граму, для МФА, для обнаружения капсулы по Михину (приложение 3.2) или Ребигеру (приложение 3.3).

### Примечание.

При отсутствии роста культур в посевах из нативного материала проводить выделение чистой культуры от биопробных животных.

### Материал и оборудование

МПА рН 7,2–7,6 . . . . .	4 чашки
5%-й кровяной агар . . . . .	2 чашки
МПБ . . . . .	10 пробирок
0,9%-й раствор хлористого натрия . . . . .	150 мл
Люминесцирующая сибиреязвенная сыворотка . . . . .	0,4 мл
Фиксатор: 96%-й спирт, содержащий 3 % $H_2O_2$ . . . . .	200 мл
Глицерин для микроскопии . . . . .	0,2 мл
6%-й раствор $H_2O_2$ , содержащий 0,5 % моющего средства . . . . .	3 л
Раствор синьки Леффлера . . . . .	0,1 мл



Раствор Ребигера .....	0,5 мл
Предметное стекло .....	16 шт.
Покровное стекло .....	4 шт.
Иммерсионное масло .....	0,5 мл
Нелюминесцирующее иммерсионное масло .....	0,2 мл
Стакан для промывания мазков .....	3 шт.
Набор для окрашивания мазков по Граму .....	1 шт.
Кристаллизатор для промывания мазков .....	1 шт.
Микроскоп световой .....	1 шт.
Люминесцентный микроскоп .....	1 шт.
Термостат на 37 °С .....	1 шт.

## ЗАНЯТИЕ 6 (4,5 ч)

### ИССЛЕДОВАНИЕ МАТЕРИАЛА ОТ БОЛЬНОГО И ПОЧВЫ НА ОБНАРУЖЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

#### 1. Продолжение исследования содержимого карбункула больного: идентификация культуры

1.1. Просмотреть посевы на секторах 5%-го кровяного агара и МПБ. Проверить культуры на чистоту роста в мазках, окрашенных по Граму.

1.2. Проверить выделенную культуру на чувствительность к сибирезавенному бактериофагу.

1.3. Посеять выделенную культуру в желатин уколом, 0,3%-го ПЖА, на чашку МПА с желтком, на среду ГКИ, на чашку МПА с ФФФ, на МПА, содержащий 10 и 50 ЕД/мл пенициллина, на скошенный МПА.

1.4. Поставить тест «жемчужное ожерелье»:

а) методом Груз (приложение 3.7);

б) методом посева на чашки МПА с пенициллином (приложение 3.6).

1.5. Изучить чувствительность культуры, выделенной из карбункула больного к антибактериальным препаратам методом диффузии в агар с использованием дисков (приложение 3.16).

1.6. Просмотр посевов от биопробных животных.

#### 2. Продолжение исследования почвы: идентификация культуры

2.1. Просмотреть посевы на секторах 5%-го кровяного агара и МПБ. Проверить культуры на чистоту роста в мазках, окрашенных по Граму.

2.2. Проверить выделенную культуру на чувствительность к сибирязвенному бактериофагу.

2.3. Посеять выделенную культуру в желатин уколом, 0,3%-го ПЖА, на чашку МПА с желтком, на среде ГКИ, на чашку МПА с ФФФ, на МПА, содержащий 10 и 50 ЕД/мл пенициллина, на скошенный МПА.

2.4. Поставить тест «жемчужное ожерелье»:

а) методом Груз (приложение 3.7);

б) методом посева на чашки МПА с пенициллином (приложение 3.6).

2.5. Просмотр посевов от биопробных животных.

**Примечание:**

а) за 3 до предлагаемой работы отсеять изучаемые культуры на МПБ и МПБ с пенициллином;

б) посевы культур в желатине и в 0,3 % ПЖА поставить при комнатной температуре.

**Материал и оборудование**

0,3%-й ПЖА . . . . .	2 пробирки
МПА с желтком . . . . .	2 чашки
Среда ГКИ . . . . .	2 пробирки
МПА с 0,01%-м ФФФ . . . . .	2 чашки
МПА с пенициллином 10 ЕД/мл . . . . .	2 чашки
МПА с пенициллином 50 ЕД/мл . . . . .	2 чашки
Скошенный МПА . . . . .	2 пробирки
МПА рН 7,2–7,6 . . . . .	5 чашек
МПА с пенициллином 0,5 ЕД/мл . . . . .	2 чашки
МПА с пенициллином 0,05 ЕД/мл . . . . .	2 чашки
МПБ . . . . .	2 пробирки
МПБ с пенициллином 0,5 ЕД/мл . . . . .	2 пробирки
Фиксатор: 96%-й спирт, содержащий 3 % $H_2O_2$ . . . . .	200 мл
Диски с антибиотиками:	
бензилпенициллин . . . . .	1 шт.
тетрациклин . . . . .	1 шт.

ампициллин . . . . .	1 шт.
цефазолин . . . . .	1 шт.
Сибиреязвенный бактериофаг . . . . .	0,2 мл
6%-й раствор $H_2O_2$ , содержащий 0,5 % моющего средства . . . . .	3 л
10%-я серная кислота . . . . .	40 мл
Двууглекислая сода . . . . .	5 г
Эксикатор или $CO_2$ -инкубатор . . . . .	1 шт.
Иммерсионное масло . . . . .	0,5 мл
Предметное стекло . . . . .	8 шт.
Покровное стекло . . . . .	4 шт.
Набор для окрашивания мазков по Граму . . . . .	1 шт.
Кристаллизатор для промывки мазков . . . . .	1 шт.
Термостат на 37 °С . . . . .	1 шт.
Микроскоп световой. . . . .	1 шт.

## ЗАНЯТИЕ 7 (4 Ч)

### ИССЛЕДОВАНИЕ МАТЕРИАЛА ОТ БОЛЬНОГО И ПОЧВЫ НА ОБНАРУЖЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

#### 1. Продолжение исследования содержимого карбункула больного: идентификация культуры

1.1. Отметить протеолитическую активность и характер роста в желатине.

1.2. Произвести учет пенициллиназной, лецитиназной, фосфатазной активности на чашках МПА с пенициллином, МПА с желтком и на МПА с 0,01%-м ФФФ.

1.3. Учесть пробы с сибиреязвенным бактериофагом.

1.4. Произвести учет результатов изучения чувствительности культуры от больного к антибиотикам (приложение 3.16).

1.5. Приготовить мазки для обнаружения капсулы у культур, выращенных в  $CO_2$ -инкубаторе на среде ГКИ.

1.6. Заполнить паспорт на выделенную культуру (приложение).

1.7. Передать все посевы для обеззараживания.

#### 2. Продолжение исследования почвы: идентификация культуры

2.1. Отметить протеолитическую активность и характер роста в желатине.

2.2. Произвести учет пенициллиназной, лецитиназной, фосфатазной активности на чашках МПА с пенициллином, МПА с желтком и на МПА с 0,01%-м ФФФ.

2.3. Учесть пробы с сибиреязвенным бактериофагом.

2.4. Заполнить паспорт на выделенную культуру (приложение).

2.5. Передать все посевы для обеззараживания.

### Материал и оборудование

Нашатырный спирт . . . . .	0,5 мл
Тушь . . . . .	1,0 мл
Синька Леффлера . . . . .	1,0 мл
Фиксатор: 96%-й спирт, содержащий 3 % $H_2O_2$ . . . . .	200 мл
0,9%-й раствор хлористого натрия . . . . .	1,0 мл
Иммерсионное масло . . . . .	0,5 мл
Предметное стекло . . . . .	2 шт.
Кристаллизатор для промывания мазков . . . . .	1 шт.
6%-1 раствор $H_2O_2$ , содержащий 0,5 % моющего средства . . . . .	3 л
Микроскоп световой . . . . .	1 шт.
Бланк паспорта . . . . .	2 шт.

## ЗАНЯТИЕ 8 (7,5 Ч)

### ИССЛЕДОВАНИЕ МАТЕРИАЛА ОТ БОЛЬНОГО И ПОЧВЫ НА ОБНАРУЖЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

#### 1. Исследование материала от больного и почвы для выявления ДНК возбудителя сибирской язвы при помощи метода ПЦР

1.1. Отбор и обеззараживание проб для исследования в ПЦР.

1.2. Выделение ДНК

1.3. Постановка ПЦР и детекция продуктов амплификации в режиме «реального времени».

1.4. Учет и оценка результатов.

#### **1.1. Отбор и обеззараживание проб для исследования в ПЦР**

1.1.1. Отбор материала для исследования в ПЦР

Материал от больного (содержимое карбункула) отбирают с соблюдением правил забора клинического материала стерильной платиновой петлей или пастеровской пипеткой в количестве 0,1–1,3 мл. Кожные элементы предварительно очищают ватным тампоном,

смоченным спиртом или эфиром. Материалом для исследования могут быть также пробы из внешней среды: почва, смывы с поверхностей, а также суспензии органов павших животных и клеточные взвеси ( $10^6$ – $10^8$  м.к./мл) при идентификации выделенных культур.

Пробы почвы освобождают от корней, камешков и тщательно перемешивают. От каждой пробы берут 90–100 г почвы, помещают в колбу, заливают стерильным 0,9%-м раствором натрия хлорида из расчета получения 15–20 мл суспензии. Колбу закрывают, тщательно встряхивают в течение 5–10 мин, дают отстояться 3–5 мин и надсадочную жидкость переносят в пробирку для исследования. Для избавления от посторонней микрофлоры пробы делят на две части, одну из которых подвергают термической обработке на водяной бане при 80 °С в течение 20 мин.

1.1.2. Обеззараживание подлежащего исследованию материала, инфицированного (или подозрительного на зараженность) *B. anthracis*, при работе 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 бацилл 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 pH 7,6 и инкубируют с встряхиванием при температуре 37 °С в течение 2,5 ч.

2-й этап. В пробирки с материалом добавляют раствор бензилпенициллина в расчете 1000 ЕД/мл, инкубируют при 37 °С в течение 15 мин, затем прогревают в твердотельном термостате или на водяной бане при температуре 100 °С в течение 10 мин – 30 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 материала, обеззараженного, как описано выше, используют наборы реагентов, рекомендованные в инструкции по применению набора для ПЦР-амплификации.

## **1.2. Выделение ДНК**

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

1.2.1. Подготовить отрицательный контроль выделения ДНК (ОК). В пробирку объемом 1,5 мл внести 300 мкл лизирующего раствора и мкл ОК – отрицательного контрольного образца.

1.2.2. Отдельными наконечниками с аэрозольным барьером внести в каждую пробирку с пробами, включая ОК, по 10 мкл ВКО STI-704.

1.2.3. Пробы тщательно перемешать на вортексе, прогреть 5 мин при температуре 65 °С, осадить на вортексе 5 с. Если в пробирках находятся взвешенные частицы (не растворившийся полностью материал), то необходимо центрифугировать пробирку на микроцентрифуге 5 мин при 8–10 тыс. об/мин (10–13 тыс. об/мин при радиусе ротора 70 мм) и использовать для выделения ДНК надосадочную жидкость, перенести ее в новую пробирку.

1.2.4. Тщательно ресуспендировать сорбент универсальный на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по 25 мкл ресуспендированного сорбента универсального. Перемешать на вортексе, поставить в штатив на 5 мин, еще раз перемешать и оставить в штативе на 5 мин.

1.2.5. Осадить сорбент универсальный в пробирках центрифугированием при 8–10 тыс. об/мин (10–13 тыс. об/мин при радиусе ротора 70 мм) в течение 30 с. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

1.2.6. Добавить в пробы по 300 мкл раствора для отмывки 1, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, центрифугировать 30 с при 8–10 тыс. об/мин (10–13 тыс. об/мин при радиусе ротора 70 мм) на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы. При работе с образцами крови допустимо применение дозатора с индивидуальным наконечником с аэрозольным барьером для механического разбивания осадка.

1.2.7. Добавить в пробы по 500 мкл раствора для отмывки 2, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента

универсального, центрифугировать 30 с при 8–10 тыс. об/мин (10–13 тыс. об/мин при радиусе ротора 70 мм) на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

1.2.8. Повторить отмывку еще раз, следуя п. 7, удалить надосадочную жидкость полностью.

1.2.9. Поместить пробирки в термостат при температуре 65 °С на 5–10 мин для подсушивания сорбента универсального. При этом крышки пробирок должны быть открыты.

1.2.10. В пробирки добавить по 50 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 65 °С на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе.

1.2.11. Центрифугировать пробирки при 8–10 тыс. об/мин (10–13 тыс. об/мин при радиусе ротора 70 мм) в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

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.

### **1.3. Постановка ПЦР и детекция продуктов амплификации в режиме «реального времени»**

Подготовка к амплификации проводится в ПЦР-боксе с использованием набора реагентов для выявления ДНК *Bacillus anthracis* в биологическом материале и объектах окружающей среды «АмплиСенс@ *Bacillus anthracis*-FRT» (пр-во ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора).

Общий объем реакции – 25 мкл, объем ДНК-пробы – 10 мкл.

#### **Порядок работы:**

1.3.1. Подготовка пробирок для проведения ПЦР.

1.3.1.1. Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-1-FRT *Bacillus anthracis* для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб (1 – отрицательная и 3 – положительные контрольные пробы).

1.3.1.2. На поверхность воска внести по 7 мкл ПЦР-смеси-2-FL, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-1-FRT *Bacillus anthracis*.

1.3.2. Проведение амплификации.

1.3.2.1. В подготовленные для ПЦР пробирки внести отдельными наконечниками с аэрозольным барьером по 10 мкл ДНК-проб, выделенных из исследуемых или контрольных проб этапа выделения ДНК.

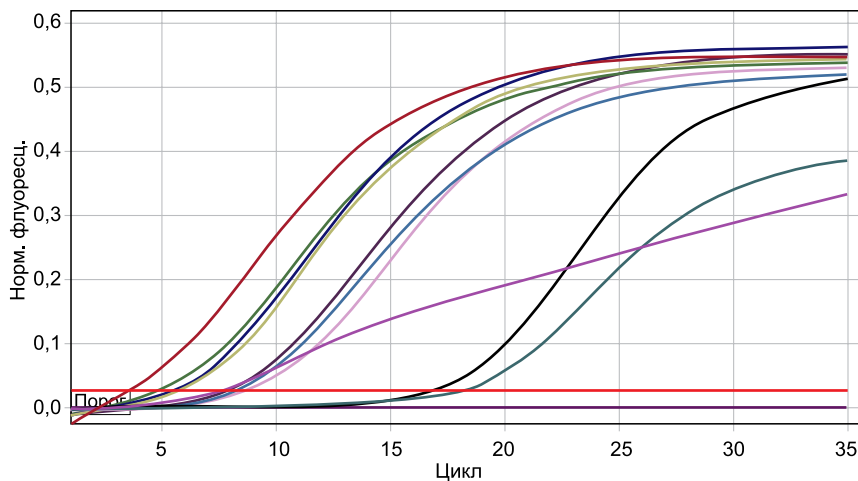
1.3.2.2. Поставить контрольные реакции амплификации:

- а) отрицательный контроль (К-) – внести в подготовленную пробирку 10 мкл ДНК-буфера.
- б) положительный контроль (К1+) – внести в подготовленную пробирку 10 мкл ПКО ДНК *Bacillus anthracis* рХО1.
- в) положительный контроль (К2+) – внести в подготовленную пробирку 10 мкл ПКО ДНК *Bacillus anthracis* рХО2.
- г) положительный контроль (ВК+) – внести в подготовленную пробирку 10 мкл ПКО ST1.

1.3.3. Программирование амплификатора и запуск программы

Поместить предварительно подготовленные пробирки в амплификатор. Настроить программу амплификации согласно инструкции к набору реагентов. Запустить программу кнопкой «Start run»/«Старт».

#### 1.4. Учет и оценка результатов



**Рис. 6.** Результаты ПЦР с использованием тест-системы для обнаружения ДНК сибиреязвенного микроба в режиме «реального времени»

Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (рис. 6), что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла «Сt» в соответствующей графе в таблице результатов (табл. 3).



Таблица 3

Значение Ct по каналу			Результат анализа
FAM/Green	JOE/Yellow	ROX/Orange	
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

## Материал и оборудование

### Для пробоподготовки и герминации

Пробирки лабораторные стеклянные	2 шт.
Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл (например, «Ахуген», США)	10 шт.
Штатив для стеклянных пробирок	1 шт.
Штатив для микропробирок объемом 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, «Ахуген», США)	1 шт.
Автоматический дозатор до 200 мкл (например, «Ленпипет», Россия)	1 шт.
Автоматический дозатор до 1000 мкл (например, «Ленпипет», Россия)	1 шт.
Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 и 1000 мкл (например, «Ахуген», США)	1 уп.
Термостат для пробирок типа «Эппендорф» (например, «Биоком», Россия)	1 шт.
Бульон Хоттингера (рН 7,2)	2 мл
Дистиллированная вода	20 мл
Бензилпенициллина натриевая соль	1 фл.

### Для выделения ДНК из исследуемого материала

Стерильный ламинарный шкаф (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия)	1 шт.
Термостат для пробирок типа «Эппендорф» (например, «Биоком», Россия)	1 шт.
Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия)	1 шт.
Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс. об/мин (например, «MiniSpin», «Eppendorf», Германия)	1 шт.
Вортекс (например «ТЭТА-2», «Биоком», Россия)	1 шт.
Автоматический дозатор до 200 мкл (например, «Ленпипет», Россия)	1 шт.
Автоматический дозатор до 1000 мкл (например, «Ленпипет», Россия)	1 шт.
Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл (например, «Ахуген», США)	10 шт.

Штативы для микропробирок объемом 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, «Ахуген», США) . . . . .	1 шт.
Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 и 1000 мкл (например, «Ахуген», США) . . . . .	1 уп.
Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл (например, «Ахуген», США) . . . . .	1 уп.
Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С . . . . .	1 шт.
Емкость с дезинфицирующим раствором . . . . .	1 шт.

#### **Для проведения ПЦР-амплификации и детекции продуктов амплификации**

Амплификатор «Rotor-Gene Q», Германия (с компьютером) или эквивалентный	1 шт.
ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия)	1 шт.
Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия) . . . . .	1 шт.
Автоматический дозатор 0,5–10 мкл (например, «Ленпипет», Россия) . . . . .	2 шт.
Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 10 мкл (например, «Ахуген», США) . . . . .	1 уп.
Штатив для микропробирок 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) . .	1 шт.
Штатив для микропробирок 0,2 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) . . .	1 шт.
Емкость с дезинфицирующим раствором . . . . .	1 шт.

## **ЗАНЯТИЕ 9 (0,5 Ч)**

### **ИССЛЕДОВАНИЕ КОЖСЫРЬЯ В РЕАКЦИИ АСКОЛИ**

#### **Подготовка материала для реакции Асколи**

Измельчить обеззараженное кожевенное сырье, добавить 0,9%-й раствор хлористого натрия 1 : 10, настоять при комнатной температуре 16–18 ч.

#### **Примечание:**

приложение 3.12

#### **Материал и оборудование**

Кожсырье в чашках Петри . . . . .	1 объект
Ножницы . . . . .	1 шт.
Стакан с этиловым спиртом 96 % . . . . .	1 шт.
0,9%-й раствор хлористого натрия . . . . .	10 мл
Чашка Петри с тампоном . . . . .	1 шт.
Пробирка . . . . .	1 шт.

## **ЗАНЯТИЕ 10 (1 Ч)**

### **ИССЛЕДОВАНИЕ КОЖСЫРЬЯ В РЕАКЦИИ АСКОЛИ**

#### **Постановка реакции Асколи**

1. Профильтровать полученный экстракт до полной прозрачности через асбестовую вату или фильтровальную бумагу.
2. Поставить реакцию Асколи (приложение 3.12).

#### **Материал и оборудование**

Преципитирующая сибиреязвенная сыворотка . . . . .	0,5 мл
Нормальная сыворотка . . . . .	0,5 мл
Сибиреязвенный антиген . . . . .	0,5 мл
Коммерческий стандартный сибиреязвенный антиген . . . . .	1 шт.
Уленгутовская преципитационная пробирка . . . . .	5 шт.
Фильтры асбестовые . . . . .	1 г
Воронка . . . . .	1 шт.
Пробирка . . . . .	1 шт.
Пластина для фиксации Уленгутовских пробирок . . . . .	1 шт.
0,9%-й раствор хлористого натрия . . . . .	0,5 мл

## **ВЫДАЧА ЗАКЛЮЧЕНИЙ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ЛАБОРАТОРНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ НА СИБИРСКУЮ ЯЗВУ**

После проведения соответствующих этапов лабораторного исследования на сибирскую язву в определенные сроки можно давать следующие заключения о его результатах. В расчетные сроки не включено время, необходимое для подготовки проб (разбор проб и предварительная очистка, фильтрование, разведение или концентрирование материала, разделение на аликвоты).

### ***Предварительные результаты специфической индикации***

*При исследовании патологического материала от людей и животных:*

- через 2–6 ч – по результатам световой микроскопии и МФА с вегетативной люминесцирующей сывороткой;
- через 8–12 ч – по результатам ПЦР;
- через 2–6 ч – по результатам реакции преципитации по Асколи.

*При исследовании секционного материала от трупов людей и животных, а также кож, шкур, шерсти, мяса и мясопродуктов:*

- через 2–6 ч – по результатам реакции преципитации по Асколи;
- через 2–6 ч – по результатам МФА с антиспоровой люминесцирующей сывороткой;
- через 8–12 ч – по результатам ПЦР.

*При исследовании материала из объектов внешней среды:*

- через 2–6 ч – по результатам МФА с антиспоровой люминесцирующей сывороткой;
- через 2–6 ч – по результатам РНГА;
- через 8–12 ч – по результатам ПЦР.

### ***Окончательные результаты специфической индикации***

*При исследовании любого материала, подозрительного на зараженность возбудителем сибирской язвы, через 48 ч на основании результатов:*

- ПЦР с материалом из типичных колоний;
- МФА при окраске люминесцирующей вегетативной сибирезавенной сывороткой культуры из типичных колоний.

### ***Окончательные результаты полного лабораторного анализа***

*При исследовании любого материала, подозрительного на зараженность возбудителем сибирской язвы, через 2–10 сут. на основании:*

- морфологии колоний на питательных средах, в том числе и дифференциально-диагностической, и характера роста в МПБ;
- морфологии в мазках из выросших подозрительных колоний, МПБ;
- патологоанатомической картины у забитых на 2–3 сутки или павших белых мышей;
- обнаружения капсулы в мазках-отпечатках из органов биопробных животных;
- морфологии колоний при посеве органов на питательном агаре;
- характера роста колоний на 1%-м бикарбонатно-сывороточном агаре и морфологии клеток в мазках, приготовленных из колоний или взвеси микробов, выросших на жидкой среде ГКИ;
- результатов теста с сибиреязвенным бактериофагом;
- результатов теста на щелочную фосфатазу;
- результатов теста на гемолиз на агаре с дефибринированной кровью барана;
- результатов теста на лецитиназу;
- результатов теста на подвижность;
- результатов теста «жемчужного ожерелья».

## ПРИЛОЖЕНИЯ

### 1. РЕЖИМ РАБОТЫ С БАКТЕРИЯМИ, ОБРАЗУЮЩИМИ СПОРЫ

Работа с культурой возбудителя сибирской язвы и зараженными животными должна проводиться в соответствии с требованиями санитарно-эпидемиологических правил СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

В зависимости от характера выполняемой работы сотрудники обязаны пользоваться защитной одеждой I–III типа. Забор материала из объектов окружающей среды, разбор его в лаборатории, работа с экспериментальными животными проводятся в противочумном костюме I типа. При проведении индикации и идентификации, изучении биологических свойств возбудителя сибирской язвы рекомендуется надевать костюм III типа, работать над кюветой или в боксах биологической безопасности II–III классов.

При проведении дезинфекции необходимо учитывать высокую устойчивость спор возбудителя сибирской язвы к действию физических и химических факторов. Для бактерий, образующих споры, при химическом методе обеззараживания согласно приложению 2 СанПиН 3.3686-21, регламентированы следующие дезинфицирующие средства:

1) хлорсодержащие или хлорактивные средства с содержанием активного хлора 24–54 % (хлорамин, хлорная известь или белильная термостойкая известь, кальция гидроксид нейтральный (КГН), двуосновная соль гипохлорита кальция (ДСГК);

2) дезинфицирующие средства на основах натриевой соли дихлоризоциануровой и/или трихлоризоциануровой кислот в виде таблеток и гранул;

3) кислородактивные средства (перекись водорода с 0,5 % моющего средства 3 % – при 50 °С; 6 % – при 20 и 50 °С;

4) альдегиды (формалин 20%-й, 40%-е по формальдегиду водные растворы);

5) щелочи (едкий натр (10 % по препарату раствор при температуре 70 °С).

В лабораториях, работающих с возбудителем сибирской язвы, наиболее широко применяются рабочие растворы перекиси водорода

да ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), которые готовят из пергидроля (30–35 %). Для снижения высокого поверхностного натяжения  $\text{H}_2\text{O}_2$  в ее растворы добавляют моющие средства до 0,5%-й концентрации. Водные растворы перекиси водорода с 0,5 % моющего средства применяют в концентрациях: 3%-й – при 50 °С; 6%-й – при 20 и 50 °С. Повышение температуры смеси до 50–60 °С значительно усиливает бактерицидную активность и позволяет снизить экспозицию 6%-го раствора с 6 ч до одного часа. Срок хранения приготовленных растворов не более одних суток. Приготовление рабочих растворов и активацию производят в резиновых перчатках, защитных очках, 4-слойной марлевой маске.

Кроме вышеперечисленных веществ, для дезинфекции применяют растворы дезинфицирующих средств с ПАВ («Велтолен», «Септодор-форте» и др.). Применение их ограничено ввиду высокой концентрации, токсичности и спорицидной активности при прогревании рабочих растворов до 60 °С не менее часа.

В лаборатории основным методом обеззараживания объектов, инфицированных возбудителем сибирской язвы, является автоклавирование при температуре  $132 \pm 2$  °С под давлением 0,20 МПа ( $2,0 \text{ кгс/см}^2$ ) в течение 90 мин. Эффективность автоклавирования контролируется физическим, бактериологическим, химическим методами.

Физический метод контроля – непосредственное наблюдение за процессом стерилизации по показаниям термометра, манометра.

Бактериологический контроль осуществляется с помощью тест-объектов. В качестве тест-объектов используются индикатор биологический паровой одноразовый для контроля паровой стерильности или отмытый стерильный песок, пропитанный термофильными бактериями «С». Пробирки с тест-объектами (не менее 6 штук) помещают на разных уровнях в автоклав по схеме. Одна пробирка остается контрольной. После прохождения цикла автоклавирования, согласно инструкции по применению биологического индикатора, микропробирку заливают индикаторной средой (0,5–1 мл). Инкубируют при температуре  $55 \pm 2$  °С в течение 48 часов. Изменение цвета среды свидетельствует о росте микроорганизмов. Пробирки с песком и термофильными бактериями «С» стерильно заливают 1%-й пептонной водой (не менее 5 мл в каждую пробирку), в том числе и в контрольную. Пробирки помещают в термостат при 60 °С и выдерживают не менее 5 сут. В автоклавированных пробирках среда должна оставаться прозрачной, в контроле – мутной.

Химический контроль проводят с помощью веществ, имеющих строго определенную точку плавления: бензамид или сукцинимид ( $126 \pm 2$  °C), мочеви́на ( $132 \pm 2$  °C). К последним добавляют анилиновые краски: фуксин, сафранин и др., которые при плавлении индикатора окрашивают его в тот или иной цвет. В настоящее время используются индикаторы паровой стерилизации химические одноразовые для контроля режимов обеззараживания паровым методом 132 °C – 90 мин, 134 °C – 60 мин.

### Дезинфекция

При работе за лабораторным столом пипетки, отработанные предметные и покровные стекла погружают в сосуд с 6%-м раствором перекиси водорода с добавлением 0,5%-го моющего средства не менее чем на 60 мин, после чего дезинфицирующий раствор разбавляют водопроводной водой и сливают в канализацию, а пипетки кипятят в мыльном растворе или 2%-м растворе пищевой соды.

Приготовленные мазки из споровой культуры фиксируют 30 мин 96%-м этиловым спиртом, содержащим 3 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ . После отмывания мазков вода подлежит обеззараживанию автоклавированием или добавлением хлорамина до концентрации 4 % с последующим его активированием. Высушивание мазков у вентилятора не допускается.

Лабораторные столы после работы обрабатывают двукратно с интервалом 30 мин 6%-м раствором перекиси водорода с 0,5 % моющего средства. Бумагу, вату, картонные коробки и другие материалы, подлежащие уничтожению, сжигают в кремационной печи или автоклавируют, металлические предметы обжигают.

Трупы лабораторных животных автоклавируют при соответствующем режиме, а затем сжигают в кремационной печи.

Металлические ящики, садки, банки из-под животных с подстилочным материалом и экскрементами, сетчатые крышки автоклавируют или заливают на 48 ч 4%-м активированным раствором хлорамина либо 6%-м раствором перекиси водорода с 0,5 % моющего средства.

Противочумные костюмы (халаты, косынки, ватно-марлевые маски) при автоклавировании заливают водой с моющим средством или замачивают в 1%-м активированном растворе хлорамина на 2 часа либо в 3%-м растворе перекиси водорода при температуре 50 °C на 1 ч. Перчатки замачивают в 6%-м растворе перекиси водорода на 1 ч либо кипятят в 2%-м растворе соды 60 мин. Сапоги протирают 6%-м раствором перекиси водорода двукратно с интервалом



в 15 мин. Помещение обрабатывают УФО при текущей дезинфекции и парами формалина при заключительной.

После проведения текущей и заключительной дезинфекции споры возбудителя сибирской язвы должны отсутствовать.

Не ранее, чем через час, но не позднее двух часов после обработки, производят контроль эффективности дезинфекции. Для этого с поверхности 100 см<sup>2</sup> 5–10-ти объектов, подвергшихся обработке (лабораторные столы, стены, оконные рамы, двери), делают смывы ватным тампоном, смоченным стерильным 0,9%-м физиологическим раствором. Тампоны помещают в стерильные пробирки с 4–5 мл МПБ. Посевы инкубируют в термостате при 37 °С 18–24 ч. Из пробирок, в которых обнаружено помутнение бульона, производят высев на МПА и посевы выдерживают 18–20 ч при 37 °С в термостате.

Удовлетворительная оценка качества дезинфекции дается при отсутствии роста во всех исследованных смывах.

## **2. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ**

### **2.1. Агар с желтком**

К 100 мл расплавленного и охлажденного до 45 °С АХ добавляют 5–10 мл желтка куриного яйца, разведенного стерильным физиологическим раствором в соотношении 2 : 3, тщательно перемешивают, разливают в чашки.

### **2.2. Среда ГКИ**

Среда ГКИ состоит из 60 мл раствора Хенкса и 40 мл бычьей сыворотки, инактивированной при 56 °С в течение 30 мин. Компоненты тщательно перемешивают и доводят с помощью бикарбоната натрия до рН 7,2. Полученную среду стерильно разливают по 2 мл в пробирки и закрывают резиновыми пробками. Среда может храниться при температуре 4 °С длительное время.

### **2.3. МПА с 0,01%-м фенолфталеинфосфатом натрия (ФФФ)**

К 100 мл расплавленного и остуженного до 45–50 °С МПА добавляют основные растворы полимиксина М сульфата – 0,5 мл, невидимона – 0,5 мл, гризеофульвина – 1 мл, моющего средства – 1 мл, фенолфталеинфосфата натрия – 0,1 мл. После перемешивания среду разливают в чашки Петри.

**Примечание:** гризеофульвин добавляют при подозрении на заражение материала грибами.

### **2.4. Кровавый агар**

Дефибринированную кровь барана добавляют (3–5 %) в расплавленный и остуженный до 45 °С АХ, который сразу же разливают в чашки Петри.

### **2.5. Агар с пенициллином (10 и 50 ЕД/мл)**

Для приготовления агара с концентрацией пенициллина 10 ЕД/мл к 100 мл расплавленного и остуженного до 45 °С АХ 1000 ЕД пенициллина, а 50 ЕД/мл – добавлением 5000 ЕД пенициллина.

### **2.6. Бульон с пенициллином (0,5 ЕД/мл)**

На 100 мл бульона рН 7,2–7,4 добавляют 20 мл лошадиной сыворотки, прогревают 30 мин при температуре 56 °С и вносят 60 ЕД пенициллина

### **3. МЕТОДИКИ ИЗУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ**

#### **3.1. Выявление капсул методом Бурри–Гинса**

Мазок, окрашенный тушью по Бурри, фиксируют в течение 30 мин в спирте с добавлением 3 %  $H_2O_2$ . После отмывания водой красят 5 мин фуксином Пфейффера или синькой Леффлера, промывают, высушивают. Бактерии – красные или синие, капсулы – неокрашенные, фон – черный.

#### **3.2. Выявление капсулы методом Михина**

Фиксированный в 96%-м 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.

#### **3.3. Фиксирование мазка и выявление капсулы по Ребигеру**

Нефиксированный мазок в течение 30–45 сек погружается в 15%-й р-р генцианвиолета в 40%-м формалине. Капсула – розово-фиолетовая, клетка – темно-фиолетового цвета.

На всю поверхность фиксированного мазка пипеткой наносят раствор Ребигера 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.

#### **3.4. Обнаружение спор по Пешкову**

Мазок фиксируют в 96%-м этиловом спирте с 3 %  $H_2O_2$  в течение 30 мин, затем 20 сек окрашивают синькой Леффлера, нагревая стекло над пламенем горелки до закипания краски. Далее мазок промывают водой и докрашивают 0,5%-м 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.

#### **3.5. Проба с сибиреязвенным бактериофагом**

Чувствительность культуры к сибиреязвенному бактериофагу проверяют чашечным методом.

На агар в чашке Петри засевают петлей культуру сплошным газоном или наносят 3–6-часовую бульонную культуру, подсушивают в течение 30 мин. С краю чашки пастеровской пипеткой или шпри-

цем наносят каплю цельного бактериофага и, приподнимая чашку, дают стечь капле по засеянной культуре. Результаты учитывают через 6 ч инкубации при 37 °С или в более поздние сроки (через 18–24 ч). В случае положительного результата на месте нанесения капли бактериофага и «фаговой дорожки» наступает полный или частичный лизис культуры.

### **3.6. Тест «жемчужного ожерелья» на плотных питательных средах с пенициллином**

Перед постановкой пробы 2%-й питательный агар разливают по 10 мл в 3 пробирки. В первую после расплавления и охлаждения добавляют пенициллин из расчета 0,5 ЕД/мл, во вторую – 0,05 ЕД/мл, третья пробирка – контрольная (без антибиотика). Содержимое каждой пробирки выливают в заготовленные чашки. Дно каждой чашки после застывания среды расчерчивают на квадраты или кружки, на которых подписывают номер анализа. На площадь квадрата или кружка наносят одну каплю 3-часовой бульонной культуры исследуемого штамма. На одной чашке может быть поставлено до 10 проб. Чашки инкубируют при 37 °С, через 3 ч просматривают рост под микроскопом, предварительно накрыв каждый квадрат или кружок покровным стеклом. На среде, содержащей пенициллин, наблюдаются сферопласты *B. anthracis*, отдельные шары – «жемчужины», расположенные в виде цепочек. Другие аэробы имеют обычную форму клеток. В контрольной чашке *B. anthracis* и *B. cereus* образуют длинные цепи клеток.

### **3.7. Модификация теста «жемчужного ожерелья» по Груз**

К БХ рН 7,2 добавляют стерильно 20%-ной инактивированной лошадиной сыворотки и 0,5 ЕД/мл пенициллина. Соблюдая стерильность, среду разливают в пробирки по 2–3 мл и засевают 2 каплями бульонной или петлей агаровой культуры. Пробирки с посевами инкубируют в течение 3 ч при 37 °С. Затем делают мазки, которые фиксируют, окрашивают метиленовым синим 20 сек и микроскопируют. Для *B. anthracis* характерны шарообразные клетки в виде цепочек, напоминающих ожерелье из жемчуга. *B. cereus* и другие сапрофиты бацилл, на среде с пенициллином растут, не меняя морфологии. Контролем служат мазки, приготовленные из бульона без пенициллина.

### **3.8. Определение гемолитической активности**

Исследуемую культуру засевают на МПА рН 7,2–7,6 с 5 % дефибрированной крови барана. Посевы инкубируют при 37 °С в течение

18–20 ч, после чего производят учет *B. anthracis*, в отличие от *B. cereus*, не вызывает гемолиза эритроцитов в первые сутки инкубации.

### **3.9. Определение лецитиназной активности**

Наличие или отсутствие лецитиназной активности определяют в жидкой желточной среде Дрожжевкиной или на МПА с желтком, на которые засевают исследуемую культуру, выращенную в течение 24 ч на МПА. На агаровую пластинку посев производят «бляшкой» либо «змейкой». *B. anthracis*, как правило, в течение нескольких суток инкубирования при 37 °С не изменяет среду, *B. cereus* свертывает желток в первые сутки.

На плотной питательной среде с желтком *B. anthracis* растет, не образуя вокруг колоний мутной белой зоны, вокруг колоний *B. cereus* просматривается широкая мутная белая зона.

### **3.10. Определение фосфатазной активности**

Наличие или отсутствие фосфатазной активности определяют на питательной среде с фенолфталеинфосфатом натрия, на которую штрихами засевают суточную агаровую культуру для получения изолированных колоний. Через 18–20 ч инкубации при 37 °С на крышку чашки Петри вносят 1–2 мл 25%-го водного раствора аммиака. Чашку (крышкой вниз) выдерживают в течение 1 мин при  $20 \pm 2$  °С, после чего визуально проводят учет теста (крышку при этом заменяют). Большинство сибиреязвенных штаммов не способны вырабатывать фосфатазу и, следовательно, разлагать фенолфталеинфосфат натрия. Спорообразующие сапрофиты разлагают фенолфталеинфосфат натрия с образованием индикатора фенолфталеина. Выросшие на питательной среде колонии *B. anthracis* после добавления аммиака, имеющего щелочную реакцию, остаются бесцветными, а колонии спорообразующих сапрофитов окрашиваются в розовый или красный цвет.

### **3.11. Определение пенициллиназной активности**

На МПА рН 7,2–7,6, содержащий 10 и 50 ЕД/мл пенициллина, бактериологической петлей засевают суточную бульонную культуру. Посевы помещают в термостат при 37 °С на сутки. *B. anthracis* не растет на агаре с пенициллином, *B. cereus* – растет.

### **3.12. Реакция термопреципитации (по Асколи)**

Для постановки реакции необходимо иметь преципитирующую сибиреязвенную сыворотку; антиген, экстрагированный из исследуемого материала; для контроля – преципитирующую сыворотку, коммерческий стандартный сибиреязвенный антиген, нормальную

лошадиную сыворотку, экстракт от здорового животного, физиологический раствор. Все контроли, кроме первого, должны быть отрицательными.

Исследуемый материал после предварительного автоклавирования измельчают ножницами, заливают физиологическим раствором из расчета 1,0 г материала на 10 мл раствора и экстрагируют кипячением в течение 30–40 мин, при холодном способе – оставляют для экстрагирования на 16–18 часов при комнатной температуре. Экстракт фильтруют до полной прозрачности через асбестовую вату или фильтровальную бумагу.

### Техника постановки реакции

В уленгутовские пробирки вносят 0,2 мл преципитирующей сыворотки и осторожно, по внутренней стенке пробирки, наслаивают пастеровской пипеткой с тонко оттянутым капилляром исследуемый экстракт (равное количество). В момент наслаивания пробирку с сывороткой фиксируют в наклонном положении (под углом примерно 45°). После наслаивания АГ пипетку не спеша извлекают, не отрывая от стенки пробирки. Пробирку переводят в вертикальное положение. К каждому опыту ставится ряд контролей. При положительной реакции на границе соприкосновения жидкостей образуется белое кольцо не позднее, чем через 15 мин. Если кольцо отсутствует, то реакция оценивается как отрицательная.

Таблица 4

Схема постановки реакции Асколи

Ингредиенты, мл	Опыт	Контроли			
		1	2	3	4
Специфическая преципитирующая сыворотка	0,2	0,2	0,2	–	0,2
Нормальная сыворотка (животного того же вида)	–	–	–	0,2	–
Исследуемый экстракт	0,2	–	–	0,2	–
Экстракт от здорового животного	–	–	–	–	0,2
Сибирезывенный антиген	–	0,2	–	–	–
0,9%-й раствор хлористого натрия	–	–	0,2	–	–
Результат	пол. (орт.)	пол.	отр.		

### 3.13. Выявление капсулообразования *in vitro*

Капсулообразующие клетки выявляют путем посева испытуемого материала на среды ГКИ, Леффлера или молочно-солевой агар, на которые засевают несколько капель материала. Посевы помещают в эксикатор или CO<sub>2</sub>-инкубатор при 37 °С.

На дно эксикатора помещают в чашке Петри или стеклянном стаканчике двууглекислую соду из расчета 1,0 г на 1,0 л объема эксикатора. Засеянные чашки, колбы или пробирки закладывают внутрь эксикатора, закрывают крышкой, оставив небольшое отверстие, через которое осторожно вливают 10%-ю серную или соляную кислоту по 8–9 мл на каждый литр объема эксикатора. Крышку, с предварительно смазанными вазелином краями, задвигают наглухо, и эксикатор ставят в термостат.

Через 0,5–1 ч начинается капсулообразование *B. anthracis*, которое завершается к 18 ч.

Для наблюдения за капсулообразованием мазки со сред после фиксации и подсушивания окрашивают по Михину или по Гинсу и микроскопируют.

### 3.14. Выявление капсулообразования *in vivo*

Взвесь исходного материала после осаждения грубых частиц вводят по 0,2–0,5 мл внутрибрюшинно шести белым мышам. Одну пару животных наблюдают в течение 10 сут. Остальных мышей, если они выживают, забивают (по две на срок) через 1 и 2 ч. Захлороформированных мышей вскрывают. Из перитонеального экссудата, крови, печени, селезенки, легких, почек делают мазки, которые окрашивают одним из методов для обнаружения капсульных форм *B. anthracis* и люминесцирующей сибирезывенной сывороткой.

### 3.15. Метод флуоресцирующих антител (МФА)

При исследовании люминесцентно-серологическим методом готовят мазки непосредственно из изучаемой культуры, суспензий и отпечатков органов, смывов из объектов внешней среды. Мазки подсушивают и фиксируют в 96%-м этиловом спирте с добавлением 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в течение 30 мин. После высыхания препараты окрашивают люминесцирующей сывороткой (против вегетативных клеток, антиспоровой или их смесью). Для снижения неспецифического фонового свечения в препаратах из загрязненного материала применяют контрастирование. С этой целью мазки обрабатывают сме-

сю люминесцирующих сывороток и бычьего альбумина, меченого родамином. Смесь этих сывороток готовят в удвоенном рабочем разведении: например, рабочее разведение люминесцирующей сыворотки 1 : 16, а бычьего альбумина – 1 : 8, смесь составляют из разведения 1 : 8 и 1 : 4 и наносят на мазок. Дальнейшую обработку мазков проводят так же, как и при окраске люминесцирующей сывороткой.

Мазки из экссудата брюшной полости, отечной жидкости, внутренних органов или со сред ГКИ, Леффлера, молочно-солевого агара обрабатывают люминесцирующей антикапсульной сывороткой.

### **3.16. Дискодиффузионный метод (ДДМ) определения чувствительности к антибактериальным препаратам (АБП)**

Одним из методов определения чувствительности возбудителя сибирской язвы к АБП является дискодиффузионный метод.

ДДМ основан на способности АБП диффундировать из пропитанных ими бумажных дисков в питательную среду, угнетая рост микроорганизмов, посеянных на поверхности агара. Метод позволяет подразделять штаммы на чувствительные, промежуточные и резистентные на основе размера зоны ингибирования (мм) его роста.

Для контроля точности и стандартности проведения исследования в каждом опыте необходимо использовать тест-культуру с известной чувствительностью к антибиотикам. Национальный Комитет Клинических Лабораторных Стандартов (NCCLS) рекомендует для этой цели использовать *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. В качестве контрольного должен быть использован и вакцинный штамм *B. anthracis* СТИ, применяемый для иммунизации людей, основные биологические свойства которого, в т.ч. и антибиотико-чувствительность, изучены наиболее полно.

Для определения чувствительности *B. anthracis* к антибактериальным препаратам ДДМ используют агар Мюллера-Хинтона (рН 7,3 ± 0,2). Допустимые колебания значений МПК и диаметров зон ингибиции роста для контрольных штаммов представлены в таблице 5 (согласно п.7.2. МУК 4.2.2495-09).

Для определения чувствительности *B. anthracis* используют АБП, рекомендуемые для экстренной профилактики и лечения сибирской язвы.



Таблица 5  
**Допустимые колебания значений диаметров зон подавления роста для контрольных штаммов *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 и *Bacillus anthracis* STI**

Антибактериальный препарат	Содержание препарата в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста, мм					
		Агар Мюллера-Хинтона pH 7,3 ± 0,2		Агар Хоттингера pH 7,2 ± 0,1		АГВ pH 7,4 ± 0,2	
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>B. anthracis</i>	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>B. anthracis</i>	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>B. anthracis</i>
Бензилпенициллин	10	26–37	32–39	26–37	34–40	26–30	32–39
Ампициллин	10	27–35	27–35	27–35	27–35	27–35	27–32
Цефазолин	30	29–35	29–35	29–35	29–35	29–35	29–35
Цефалексин	30	29–37	29–35	29–37	29–33	29–35	29–35
Эритромицин	15	22–30	18–24	22–30	18–24	22–30	18–24
Азитромицин	30	24–30	24–30	24–30	24–30	21–26	21–26
Линкомицин	15	22–32	22–30	22–32	22–30	22–32	22–30
Канамидин	30	19–26	22–30	19–26	22–30	19–26	19–26
Гентамицин	10	19–27	24–32	19–27	24–30	19–27	24–30
Стрептомицин	10	18–22	18–30	18–22	18–30	18–22	19–29
Амикацин	30	20–26	26–32	20–26	26–32	20–26	20–26
Тетрациклин	30	24–30	30–40	24–30	30–40	24–30	30–35
Доксициклин	10	23–29	30–40	23–29	30–40	23–29	27–32
Рифампицин	5	26–34	20–26	26–34	20–26	26–34	19–22
Ципрофлоксацин	5	22–30	27–35	22–30	27–35	22–30	25–30
Офлоксацин	5	24–28	27–35	24–28	27–35	24–28	23–30
Пефлоксацин	10	17–28	27–35	17–28	27–35	17–28	22–30
Ломефлоксацин	10	23–29	27–35	23–29	27–35	23–29	22–30
Меропенем	10	29–37	30–37	29–37	30–37	27–35	27–30

Препараты первого ряда, к которым в первую очередь определяют чувствительность сибиреязвенного микроба при выделении возбудителя от больного: бензилпенициллин, ампициллин, доксициклин, тетрациклин, ципрофлоксацин (или офлоксацин, пефлоксацин), рифампицин. В последние годы широкое применение получили антибиотики класса карбапенемов – меропенем, имипенем. Изучение чувствительности сибиреязвенного микроба к данным антибиотикам позволило рекомендовать эту группу препаратов для лечения септической формы сибирской язвы и в случае экстренной профилактики при ингаляционном заражении.

К препаратам второго ряда относят антибиотики группы аминогликозидов, цефалоспоринов, макролидов. Следует отметить, что сибиреязвенный микроб чувствителен только к цефалоспорином (ЦФ) I поколения (цефазолин и др.), тогда как к ЦФ II–IV поколений (цефуроксим, цефтазидим, цефтриаксон, цефотаксим) устойчив.

При определении чувствительности сибиреязвенного микроба с помощью ДДМ для посева используют типичные колонии из 16–18-часовых агаровых культур. Из выросших колоний готовят взвесь микробов в 0,85%-м растворе хлорида натрия, доводя плотность инокулюма до 10 ед. по стандарту мутности Центра экспертизы и контроля МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, что соответствует  $\sim 2 \times 10^7$  КОЕ/мл. Эту взвесь в объеме 0,3 мл ( $\sim 6 \times 10^6$  КОЕ) наносят на поверхность питательной среды и равномерно распределяют шпателем. Чашки выдерживают 15 мин при комнатной температуре для выпитывания суспензии. Диски накладывают стерильным пинцетом на поверхность засеянной питательной среды на одинаковом расстоянии один от другого, отступив около 2 см от стенки чашки (не более 4 дисков на чашку диаметром 90–100 мм). Вновь выдерживают 15 мин при комнатной температуре, а затем, перевернув чашки с посевами вверх дном, инкубируют при 37 °С в течение 18–20 ч (не более). Измеряют диаметр зон задержки роста вокруг дисков, включая диаметр самого диска, с точностью до 1 мм. При расплывчатых краях зоны или при зонах с двойными контурами измеряют диаметр зоны по наиболее четкой границе. Для интерпретации полученных результатов пользуются таблицей 6.

Таблица 6

**Критерии интерпретации результатов исследования *Bacillus anthracis*: пограничные значения диаметров зон подавления роста (мм) и величин МПК (мг/л) антибактериальных препаратов**

Антибактериальный препарат	Содержание препарата в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста, мм	
		S*	R*
Бензилпенициллин	10	≥ 26	≤ 16
Ампициллин	10	≥ 27	≤ 16
Цефазолин	30	≥ 29	≤ 16
Цефалексин	30	≥ 29	≤ 16
Эритромицин	15	≥ 24	≤ 16
Азитромицин	30	≥ 24	≤ 16
Линкомицин	15	≥ 23	≤ 16
Канамицин	10	≥ 19	≤ 16
Гентамицин	10	≥ 23	≤ 16
Стрептомицин	10	≥ 18	≤ 16
Амикацин	30	≥ 23	≤ 16
Тетрациклин	30	≥ 23	≤ 16
Доксициклин	10	≥ 23	≤ 16
Рифампицин	5	≥ 20	≤ 13
Ципрофлоксацин	5	≥ 17	≤ 15
Офлоксацин	5	≥ 19	≤ 15
Пефлоксацин	10	≥ 19	≤ 15
Ломефлоксацин	10	≥ 20	≤ 15
Меропенем	10	≥ 26	≤ 15
Имипенем	–	–	–

**Примечание.** S\* – чувствительный, R\* – устойчивый.

## 4. ПАСПОРТ ШТАММА

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

ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский  
противочумный институт Роспотребнадзора,  
664047 Иркутск, ул. Трилиссера, 78

#### ПАСПОРТ ШТАММА

Вид микроба \_\_\_\_\_ Инвентарный № штамма \_\_\_\_\_  
№ штамма при поступлении \_\_\_\_\_  
Дата выделения \_\_\_\_\_  
Объект выделения \_\_\_\_\_  
Метод выделения \_\_\_\_\_  
Место выделения \_\_\_\_\_  
Штамм выделил(а) \_\_\_\_\_  
Откуда получен \_\_\_\_\_  
Дата получения в музей \_\_\_\_\_  
Штамм проверили \_\_\_\_\_

#### Характеристики штамма

Морфология микроба \_\_\_\_\_ Тинкториальные свойства \_\_\_\_\_  
Капсулообразование: *in vitro* \_\_\_\_\_ *in vivo* \_\_\_\_\_  
Рост в анаэробных условиях \_\_\_\_\_  
На полужидком 0,3%-м агаре (уколом) \_\_\_\_\_  
Культуральные свойства: АХ \_\_\_\_\_ БХ \_\_\_\_\_  
Рост при 37 °С \_\_\_\_\_ ; при 45 °С \_\_\_\_\_  
Рост при рН 5,7 в жидкой среде Сабуро \_\_\_\_\_ на плотной среде Сабуро \_\_\_\_\_  
Фаголизабельность \_\_\_\_\_  
Феномен «жемчужного ожерелья» по методу Груз \_\_\_\_\_  
Рост на среде с пенициллином: 10 ЕД \_\_\_\_\_ ; 50 ЕД \_\_\_\_\_  
Антибиотикограмма \_\_\_\_\_

#### Биохимические свойства

Гемолиз эритроцитов барана на 5%-м кровяном агаре \_\_\_\_\_  
Лецитиназная активность \_\_\_\_\_  
Фосфатазная активность \_\_\_\_\_

Расщепление на средах Гисса: глюкозы \_\_\_\_\_ арабинозы \_\_\_\_\_  
глицерина \_\_\_\_\_ ксилозы \_\_\_\_\_ и т.д.

Протелитическая активность: на 12%-м желатине \_\_\_\_\_

### Серологические свойства

МФА с иммуноглобулинами спорowymi \_\_\_\_\_ вегетативными \_\_\_\_\_

РНГА с антительным эритроцитарным диагностикумом \_\_\_\_\_

ИХТ для обнаружения спор \_\_\_\_\_

### Вирулентность

LD<sub>50</sub> белые мыши \_\_\_\_\_ LD<sub>50</sub> морские свинки \_\_\_\_\_

### Генетические особенности

ПЦР \_\_\_\_\_ MLVA профиль \_\_\_\_\_ SNP профиль \_\_\_\_\_

Метод хранения культуры \_\_\_\_\_

Срок пересева \_\_\_\_\_

Оптимальная температура хранения \_\_\_\_\_

Условия культивирования \_\_\_\_\_

**Ответственный за коллекцию**

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ	– антиген
АХ	– агар Хоттингера
АБП	– антибактериальный препарат
БХ	– бульон Хоттингера
в/б	– внутрибрюшинно
ГКИ	– Государственный контрольный институт медицинских биологических препаратов им. Тарасевича
ДДМ	– дискодиффузионный метод
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
л/узел	– лимфатический узел
ЛФ	– летальный фактор
мДа	– мегадальтон
м.м.	– молекулярная масса
МПА	– мясопептонный агар
МПБ	– мясопептонный бульон
МПК	– минимальная концентрация вещества, подавляющая рост бактерии
МФА	– метод флуоресцирующих антител
ОФ	– отечный фактор
ПА	– протективный антиген
ПЖА	– полужидкий агар
п/к	– подкожно
п.н.	– пар нуклеотидов
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
ФФФ	– фенолфталеинфосфат натрия
DL <sub>50</sub>	– летальная доза для 50 % животных
DcL	– безусловно смертельная доза
pH	– водородный показатель вещества, отражающий его кислотность
pX01	– плазида токсинообразования
pX02	– плазида капсулообразования

## **КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ**

1. Номенклатурное положение возбудителя сибирской язвы.
2. Морфологические и тинкториальные свойства сибиреязвенного микроба.
3. Культуральные свойства сибиреязвенного микроба.
4. Факторы вирулентности сибиреязвенного микроба.
5. Источники сибиреязвенной инфекции.
6. Факторы и пути передачи сибиреязвенной инфекции.
7. Влияние физических и химических факторов на жизнеспособность сибиреязвенного микроба.
8. Особенности режима работы и дезинфекции с бактериями образующими споры.
9. Основные тесты идентификации и внутривидовой дифференциации сибиреязвенного микроба.
10. Материал для исследования от больных или подозрительных на заболевание сибирской язвой людей.
11. Характерные особенности патологоанатомической картины у биопробных животных, зараженных возбудителем сибирской язвы.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Методические указания МУК 4.2.2413–08 «Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы». – М., 2008.
2. Методические указания МУ 4.2.2941–11 «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики сибирской язвы для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней». – М., 2011.
3. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство / Под ред. академика РАМН Г.Г. Онищенко, академика РАМН В.В. Кутырева. – Изд. 2-е, переработанное и дополненное. – М.: ЗАО «Шико», 2013.
4. МР «Правила отбора, транспортирования, пробоподготовки костей и костных фрагментов животных для индикации сибирезавенного микроба» / З.Ф. Дугаржапова, Е.В. Кравец, В.Е. Такайшвили, Э.Г. Гольдапель, А.А. Иванова. Одобрено Ученым советом института (протокол № 1 от 04 мая 2017 г.) – Иркутск, 2017. – 11 с.
5. Маринин Л.И., Дятлов И.А. Методы изучения биологических свойств возбудителя сибирской язвы: учебно-методическое пособие). – М.: ЗАО МП «ГИГИЕНА», 2009. – 304 с.
6. Сибирская язва / Н.П. Буравцева [и др.] // Лабораторная диагностика возбудителей опасных инфекционных болезней. – Саратов, 1998. – Т. 7. – С. 50–89.
7. Сибирская язва: актуальные аспекты микробиологии, эпидемиологии, клиники, диагностики, лечения и профилактики / Г.Г. Онищенко [и др.]. – М.: ВУНЦ МЗ РФ, 1999. – 448 с.
8. Санитарные правила и нормы СанПиН 3.3686-21 Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней.
9. Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.7.2629-10 «Профилактика сибирской язвы» с изменениями по Постановлению ГГСВ РФ от 29.03.2017 г.
10. Санитарные правила СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности». – М., 1996.
11. МУК 4.2.2495–09 «Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва,



холера, туляремия, бруцеллез, сап, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам» – М., 2009.

12. Методические указания МУ 1.3.2569-09 Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности – Москва, 2009.

13. Методические рекомендации. Забор, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР - диагностики. - МЗ РФ, ЦНИИЭ – Москва, 2004.

**РУКОВОДСТВО  
К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ  
ПО ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ  
СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ**  
**Учебно-методическое пособие**

Корректор *Черных О.Л.*  
Оригинал-макет *Арсентьев Л.И.*  
Художник *Фалеев К.А.*

---

Сдано в набор 25.04.2022. Подписано в печать 17.05.2022. Бумага офсетная.  
Формат 60x84<sup>1/16</sup>. Гарнитура Cambria.  
Усл. печ. л. 3,25. Тираж 130 экз. Заказ № 018-22.

---

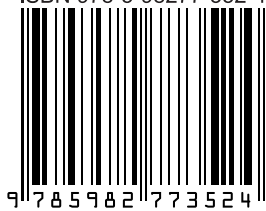
ИНЦХТ  
Иркутск, ул. Борцов Революции, 1. Тел. (395-2) 29-03-37.  
E-mail: arleon58@gmail.com





УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ

ISBN 978-5-98277-352-4



9 78 5 982 77 352 4