

Набор штаммов бактерий для обучения вопросам микробиологии и лабораторной диагностики сибирской язвы

Е.В.Растунцева, Т.А.Малюкова, Ю.А.Попов, О.Ю.Ляшова

ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Российская Федерация

В настоящее время регистрируются спорадические случаи заболевания людей и животных сибирской язвой в отдельных регионах Российской Федерации. Причины риска осложнения эпидемиологической обстановки – наличие стационарных неблагополучных по сибирской язве пунктов, завоз сырья и продукции животноводства из стран с неблагоприятной эпизоотической ситуацией. Эпидемиологический надзор за сибирской язвой опирается в том числе на результаты комплексной лабораторной диагностики, что требует целенаправленной подготовки специалистов. Актуальная задача организации практических занятий – обучение в полном объеме регламентированным методам исследования в случае подозрения на сибирскую язву при повышении безопасности приобретения навыков манипуляций с *Bacillus anthracis* путем замены вирулентных штаммов на авирулентные.

Цель. Создание набора учебных штаммов бактерий для совершенствования методического обеспечения и снижения биологических рисков при подготовке специалистов по лабораторной диагностике сибирской язвы.

Материалы и методы. В работе использованы штаммы бактерий: *B. anthracis*, *Bacillus cereus*, родов *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*. Применяли аналитический, бактериологический, иммунологические, молекулярно-генетический, биологический методы исследования.

Результаты. Разработаны критерии подбора штаммов возбудителя сибирской язвы. Сформирован набор в составе: авирулентный и вирулентный штаммы *B. anthracis* (2), штамм *B. cereus* (1), фоновые микроорганизмы (3).

Заключение. Применение набора позволяет обучающимся освоить в полном объеме регламентированные методы лабораторной диагностики сибирской язвы, приобрести на практических занятиях навыки безопасной работы с патогенными биологическими агентами II группы, снизив вероятность лабораторного инфицирования.

Ключевые слова: *Bacillus anthracis*, учебные штаммы, подготовка специалистов, биологическая безопасность, лабораторная диагностика сибирской язвы

Для цитирования: Растунцева Е.В., Малюкова Т.А., Попов Ю.А., Ляшова О.Ю. Набор штаммов бактерий для обучения вопросам микробиологии и лабораторной диагностики сибирской язвы. Бактериология. 2025; 10(1): 91–99. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-91-99

A set of bacterial strains for training in microbiology and laboratory diagnostics of anthrax

E.V.Rastuntseva, T.A.Malyukova, Yu.A.Popov, O.Yu.Lyashova

Russian Anti-Plague Institute “Microbe” of Rosпотребнадзор, Saratov, Russian Federation

Currently, sporadic cases of anthrax in humans and animals are registered in certain regions of the Russian Federation. The reasons for the risk of complications of the epidemiological situation are the presence of stationary points unfavorable for anthrax, import of raw materials and livestock products from countries with an unfavorable epizootic situation. Epidemiological surveillance of anthrax is based, among other things, on the results of comprehensive laboratory diagnostics, which requires targeted training of specialists.

Objective. The urgent task of organizing practical classes is to fully train in regulated research methods in case of suspected anthrax while increasing the safety of acquiring skills in manipulating *Bacillus anthracis* by replacing virulent strains with avirulent ones. Creation of a set of training strains of bacteria to improve methodological support and reduce biological risks in the training of specialists in laboratory diagnostics of anthrax.

Materials and methods. The following bacterial strains were used in the work: *B. anthracis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* genera. Analytical, bacteriological, immunological, molecular genetic, and biological research methods were used.

Results. Criteria for selecting strains of the anthrax pathogen were developed. A set was formed consisting of: avirulent and virulent strains of *B. anthracis* (2), strain *B. cereus* (1), background microorganisms (3).

Для корреспонденции:

Растунцева Елена Васильевна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела образовательных программ и подготовки специалистов ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46

Телефон: (8452) 51-52-30

E-mail: rusrapi@microbe.ru

Статья поступила 09.07.2024, принята к печати 31.03.2025

For correspondence:

Elena V. Rastuntseva, MD, PhD, senior researcher of the Department of Educational Programs and Specialist Training, Russian Anti-Plague Institute “Microbe” of the Rosпотребнадзор

Address: 46 Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation

Phone: (8452) 51-52-30

E-mail: rusrapi@microbe.ru

The article was received 09.07.2024, accepted for publication 31.03.2025

Conclusion. The use of the set allows students to fully master the regulated methods of laboratory diagnostics of anthrax, acquire skills in safe work with PBA of group II during practical classes, reducing the likelihood of laboratory infection.
Key words: *Bacillus anthracis*, educational set of strains, training of specialists, biological safety, laboratory diagnostics of anthrax

For citation: Rastuntseva E.V., Malyukova T.A., Popov Yu.A., Lyashova O.Yu. A set of bacterial strains for training in microbiology and laboratory diagnostics of anthrax. Bacteriology. 2025; 10(1): 91–99. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-1-91-99

Сибирская язва продолжает оставаться одной из актуальных опасных инфекционных болезней в мире. Заболеваемость людей и животных в России на данный момент характеризуется выявлением спорадических случаев заражения в отдельных регионах, что обусловлено соблюдением мер профилактики, проведением комплексного эпидемиологического надзора [1–3]. С 2009 по 2018 г. заболели 90 человек (23 вспышки) в 14 субъектах шести федеральных округов Российской Федерации (РФ); в 2019–2020 гг. – 10 человек; в 2022–2023 гг. – 21 человек и 14 сельскохозяйственных животных (9 вспышек) в 5 субъектах трех федеральных округов РФ [1–4]. Напряженная ситуация по заболеваемости животных и людей сибиреязвенной инфекцией сохраняется на территориях стран ближнего и дальнего зарубежья, что не исключает завоз сырья и продукции животноводства с территорий с неблагоприятной эпизоотической ситуацией и может создать риск осложнения эпидемиологической обстановки в России [2, 4, 5].

В РФ сибирская язва включена в Перечень инфекционных болезней, требующих проведения мероприятий по санитарной охране территории страны [6], а также отнесена к заболеваниям, представляющим опасность для окружающих [7]. Регламентированным мероприятием по предупреждению и предотвращению сибирской язвы у человека является санитарно-эпидемиологический надзор – постоянное наблюдение за эпидемическим процессом, мониторинг заболеваемости людей, животных и циркуляции возбудителя инфекции, контроль эффективности профилактических мер. При этом одной из базовых является информация о результатах лабораторной диагностики, осуществляемой специалистами учреждений Роспотребнадзора, медицинских и ветеринарных организаций, прошедшими специальное обучение на базе противочумных учреждений Роспотребнадзора [8, 9]. Актуальность подготовки специалистов обусловлена также и тем, что возбудитель сибирской язвы (II группа патогенности) отнесен к категории А вероятных агентов биотероризма [6, 10].

Обучение регламентированным методам индикации и идентификации возбудителей особо опасных инфекций (в т.ч. сибирской язвы) в соответствии с правилами обеспечения биобезопасности осуществляют в противочумных институтах Роспотребнадзора по единой программе.

Традиционно для проведения практических занятий используют штаммы *Bacillus anthracis* II и III (вакцинный штамм) групп патогенности. Основываясь на направлении государственной политики на снижение биориска технологических процессов с использованием возбудителей инфекций и учитывая разный уровень знаний, умений и навыков безопасной работы с патогенами у слушателей курсов, актуальной и приоритетной задачей определено повышение безопасности обучающихся технологий путем замены вирулентных

штаммов сибиреязвенного микроба на авирулентные / со сниженной вирулентностью. Реализуемые в противочумных учреждениях программы профессиональной переподготовки и повышения квалификации, разработанные в соответствии с Федеральным государственным образовательным стандартом по специальности 32.08.14 «Бактериология», включают перечень профессиональных знаний, умений и навыков, приобретаемых обучающимися, но не содержат перечня штаммов бактерий для обеспечения учебного процесса [11–13].

Цель исследования: формирование учебного набора штаммов бактерий для совершенствования методического обеспечения и снижения биологических рисков при подготовке специалистов по вопросам микробиологии и лабораторной диагностики сибирской язвы.

Материалы и методы

В работе использованы штаммы *B. anthracis* (II–III группы патогенности), *Bacillus cereus* (IV группы патогенности), штаммы микроорганизмов родов *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* (IV группы патогенности), депонированные в Государственной коллекции патогенных бактерий (ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора) и отобранные на основании паспортных данных с учетом предварительно разработанных критериев.

Культуры *B. anthracis* выращивали на агаре и в бульоне Хоттингера pH 7,4 при 37°C в течение 24–48 ч. Для формирования спор культуру *B. anthracis* засеивали на скошенный агар Хоттингера pH 7,4, содержащий 60 мг% аминного азота, и культивировали при 35 ± 1°C в течение 5–7 суток [14]. Исследование проводили согласно регламентированным методам индикации, идентификации и дифференциации с применением в соответствии с инструкциями изготовителей медицинских изделий для *in vitro* диагностики, прошедших государственную регистрацию на территории РФ [8, 9, 15, 16].

Морфологию клеток изучали в мазках, окрашенных по Граму, Риббергеру, Цилю–Нильсену, Леффлеру с использованием светового микроскопа «Микмед-5» («ЛОМО», Санкт-Петербург), увеличение ×400–600, масляная иммерсия. Морфологию колоний оценивали визуально и под малым увеличением светового микроскопа.

Выявление видоспецифических антигенов осуществляли методом флуоресцирующих антител (МФА) и иммунохроматографическим тестом (ИХ-тест). МФА проводили с иммуноглобулинами диагностическими флуоресцирующими сибиреязвенными споровыми и вегетативными адсорбированными сухими (ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт») в соответствии с инструкцией. Просмотр МФА-мазков осуществляли посредством флуоресцентного микроскопа

Таблица 1. Биологические свойства штаммов <i>B. anthracis</i> – кандидатов в учебные					
Table 1. Biological properties of <i>B. anthracis</i> strains – candidates for educational purposes					
Наименование параметров / Name of parameters	Штаммы <i>B. anthracis</i> / <i>B. anthracis</i> strains				
	71/12 (2-я вакцина Ценковского) / 71/12 (2nd Tsenkovsky vaccine)	Pasteur (2-я вакцина Пастера) / (2nd Pasteur vaccine)	Sterne 34 F2	Ихтиман / Ichtiman	СТИ-1 / STI-1
Группа патогенности / Pathogenicity group	II				III
Морфология в мазках / Morphology in smears	крупные палочки, расположенные одиночно, попарно, цепочками, с обрубленными концами / large sticks, arranged singly, in pairs, in chains, with cut ends		крупные палочки, расположенные одиночно, попарно, цепочками / large sticks, arranged singly, in pairs, in chains		
Тинкториальные свойства (окраска по Граму) / Tinctorial properties (Gram staining)	Грамположительны / gram-positive				
Капсулообразование (окраска по Ребигеру) при росте на 1%-м бикарбонатно-сывороточном агаре в присутствии CO ₂ / Capsule formation (Rebiger staining) when grown on 1% bicarbonate serum agar in the presence of CO ₂	тело микробной клетки окрашивается в темно-фиолетовый цвет, капсула – в красно-фиолетовый / the body of the microbial cell is stained dark purple, the capsule is red-purple		тело микробной клетки окрашивается в темно-фиолетовый цвет, капсула отсутствует / the body of the microbial cell is stained dark purple, the capsule is absent		
Капсулообразование в организме хозяина / Capsule formation in the host organism					
Спорообразование (окраска по Цилю–Нильсену) / Spore formation (Ziehl–Neelsen staining)	овальные или круглые образования розового цвета с красным ободком по периферии, расположенные центрально, не выходящие за пределы клеточной стенки / oval or round formations of pink color with a red rim around the periphery, located centrally, not extending beyond the cell wall				
Подвижность / Mobility	–	–	–	–	–
Рост в бульоне Хоттингера pH 7,4 / Growth in Hottinger broth pH 7.4	R–форма роста – придонный хлопьевидный осадок в виде «комка ваты» с прозрачным бульоном над осадком / R–form of growth – bottom flocculent sediment in the form of a “cotton ball” with a clear broth above the sediment				
Рост на агаре Хоттингера pH 7,4 / Growth on Hottinger agar pH 7.4	R–форма роста – крупные шероховатые сухие матовые колонии с «шагреновой» поверхностью и неровными краями / R–form of growth – large, rough, dry, matte colonies with a “shagreen” surface and uneven edges				
Биохимические свойства / Biochemical properties					
Ферментация субстратов до кислоты без газа: / Fermentation of substrates to acid without gas:					
Глюкоза / glucose	+	+	+	+	+
Лактоза / lactose	–	–	–	–	–
Сахароза / sucrose	+	–	+	+	+
Маннит / mannitol	–	–	–	–	–
Манноза / mannose	–	–	–	–	–
Мальтоза / maltose	+	–	+	+	+
Фосфатазная активность / Phosphatase activity	–	–	–	–	–
Лецитиназная активность / Lecithinase activity	–	–	–	–	–
Протеолитическая активность (разжижение желатины на 3–4-е сутки) / Proteolytic activity (liquefaction of gelatin on days 3–4)	+	+	+	+	+
Гемолитическая активность (лизис эритроцитов барана) / Hemolytic activity (lysis of ram red blood cells)	–	–	–	–	–
Чувствительность к сибиреязвенному диагностическому бактериофагу «Гамма А26» / Sensitivity to the anthrax diagnostic bacteriophage “Gamma A26”	+	+	+	+	+
Тест «жемчужное ожерелье» / The Pearl Necklace Test	+	+	+	+	+
Вирулентность для белых мышей (LD ₅₀) / Virulence for white mice (LD ₅₀)	6,76•10 ²	3,16•10 ²	не вызывает гибели / does not cause death		

Плазмидный состав / Plasmid composition	pXO1+, pXO2+	pXO1+, pXO2-		
МФА / MFA	3+	3-4+		
ИХА-тест / IHA test	+	+	+	+
Патанатомические изменения у лабораторных животных / Pathological changes in laboratory animals	типичные изменения подкожной клетчатки и внутренних органов; стабильное выделение на питательных средах <i>B. anthracis</i> из всех паренхиматозных органов и крови / typical changes in subcutaneous tissue and internal organs; stable isolation of <i>B. anthracis</i> on nutrient media from all parenchymatous organs and blood	развитие на 3–4-е сутки местных изменений подкожной клетчатки в области введения культуры <i>B. anthracis</i> , выделение на питательных средах единичных колоний <i>B. anthracis</i> из тканей лимфатического узла и селезенки / development of local changes in the subcutaneous tissue in the area of <i>B. anthracis</i> culture introduction on days 3–4, isolation of single colonies of <i>B. anthracis</i> from lymph node and spleen tissue on nutrient media		
+ – положительный результат; – отрицательный результат. / + – positive result; – negative result.				

Еclipse 80i (Nicon, Япония), увеличение $\times 1000$, масляная иммерсия.

Для постановки ИХ-теста использовали «Набор реагентов для иммунохроматографического экспресс-выявления и идентификации спор возбудителя сибирской язвы» (ИХ-тест *B. anthracis*, ФБУН ГНЦ ПМБ), специфической мишенью которого является споровый антиген сибиреязвенного микроба.

Чувствительность к антибактериальным препаратам определяли диско-диффузионным методом с использованием питательного агара Мюллера–Хинтон pH $7,3 \pm 0,2$ (ФБУН ГНЦ ПМБ) и коммерческих дисков производства HIMEDIA (Индия). Учет и интерпретацию результатов проводили для *B. anthracis* согласно действующим нормативным документам [17], для *B. cereus* – по рекомендациям EUCAST [18, 19].

Изучение вирулентности штаммов (LD_{50}) проводили на самцах аутбредных белых мышей весом 18–20 г с последующей статистической обработкой полученных результатов по методу Кербера.

Для выявления *in vitro* генетических маркеров, участвующих в реализации патогенных свойств *B. anthracis*, использовали метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) [8, 9, 15]. Гены, кодирующие основные признаки вирулентности – токсинообразование (pXO1) и капсулообразование (pXO2), определяли с использованием «Набора реагентов для выявления ДНК *Bacillus anthracis* в биологическом материале и объектах окружающей среды методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» («АмплиСенс *Bacillus anthracis*-FRT»).

Результаты исследования и их обсуждение

Основу лабораторной диагностики составляют регламентированные схемы микробиологического анализа, предусматривающие выделение чистой культуры возбудителя инфекции и последующую идентификацию по ряду биологических свойств [8, 9, 15].

Проведение практических занятий при подготовке специалистов связано с использованием штаммов возбудителя сибирской язвы для решения следующих задач:

- изучение морфологических, культуральных и физиолого-биохимических свойств;

- освоение бактериологического, иммунологических и молекулярно-генетических методов лабораторной диагностики сибирской язвы, применяемых для индикации и идентификации;

- освоение биологического метода лабораторной диагностики сибирской язвы;

- дифференциация *B. anthracis* от других патогенных микроорганизмов рода *Bacillus*, вызывающих спорадические заболевания людей.

В настоящее время в учебном процессе используют как вакцинный штамм *B. anthracis* СТИ-1, имеющий остаточную вирулентность, так и вирулентные штаммы.

Использование вакцинного штамма в пробах для решения ситуационных задач по обнаружению патогена в объектах окружающей среды и материале от больных людей и животных обеспечивает биологическую безопасность на практических занятиях, однако позволяет изучить только часть биологических свойств – типичные видовые культурально-морфологические свойства; биохимические, антигенные, генетические особенности и чувствительность к сибиреязвенному бактериофагу, характерные для данного штамма [8, 15]. Вместе с тем вызывать инфекционную болезнь у человека и животных могут также штаммы, отличающиеся от *B. anthracis* СТИ-1 по ряду биологических свойств (капсулообразование, морфология колоний, биохимические свойства) и генетических характеристик (набор генов, плазмидный профиль). Также при освоении биологического метода лабораторной диагностики заражение лабораторных животных (белых мышей) вакцинным штаммом в дозе 10⁹ спор не вызывает их гибели, не обеспечивает типичной клинической и патоморфологической картины сибиреязвенной инфекции и стабильного выделения *B. anthracis* СТИ-1 из внутренних органов биопробных животных при посеве их на питательные среды. Кроме того, учебный план включает освоение дифференциации сибиреязвенного микроба от других патогенных для человека бактерий – представителей группы *B. cereus*, вызывающих пищевые токсикоинфекции, а также генерализованную форму заболевания у лиц в послеоперационном периоде или с иммунодефицитами.

Нами были сформулированы критерии подбора штаммов бактерий для обеспечения учебного процесса: штаммы *B. anthracis*

Таблица 2. Биологические свойства штаммов *B. cereus* – кандидатов в учебные
Table 2. *Biological properties of B. cereus strains – candidates for educational purposes*

Наименование параметров / Name of parameters	Штаммы <i>B. cereus</i> / <i>B. cereus</i> strains			
	ATCC 14579	504	8	var. <i>anthracoides</i> 1312
Группа патогенности / Pathogenicity group	IV			
Морфология в мазках / Morphology in smears	крупные палочки с обрубленными концами, расположенные цепочками / large sticks with cut ends, arranged in chains,			
Тинкториальные свойства (окраска по Граму) / Tinctorial properties (Gram staining)	грамположительны / gram-positive			
Капсулообразование (окраска по Ребигеру) при росте на 1%-м бикарбонатно-сывороточном агаре в присутствии CO ₂ / Capsule formation (Rebiger staining) when grown on 1% bicarbonate serum agar in the presence of CO ₂	тело микробной клетки окрашивается в темно-фиолетовый цвет, капсула отсутствует / the body of the microbial cell is stained dark purple, the capsule is absent			
Капсулообразование в организме хозяина / Capsule formation in the host organism				
Спорообразование (окраска по Цилю–Нильсену) / Spore formation (Ziehl–Neelsen staining)	Овальные или круглые образования розового цвета с красным ободком по периферии, расположенные центрально/субтерминально, не выходящие за пределы клеточной стенки / oval or round pink formations with a red rim around the periphery, located centrally/subterminally, not extending beyond the cell wall			
Подвижность / Mobility	+	+	+	+
Рост в бульоне Хоттингера pH 7,4 / Growth in Hottinger broth pH 7.4	R-форма роста – прозрачный бульон (в первые сутки возможно равномерное легкое помутнение), на дне – белый осадок, при встряхивании разбивающийся на мелкие хлопья / R-form of growth – transparent broth (uniform slight turbidity is possible during the first day), at the bottom – white sediment, which breaks into small flakes when shaken			
Рост на агаре Хоттингера pH 7,4 / Growth on Hottinger agar pH 7.4	R-форма роста – крупные шероховатые сухие матовые колонии белого цвета с неровными краями / R-form of growth – large, rough, dry, matte colonies of white color with jagged edges			
Биохимические свойства / Biochemical properties				
Ферментация субстратов до кислоты без газа: / Fermentation of substrates to acid without gas:				
Глюкоза / glucose	+	+	+	+
Лактоза / lactose	–	–	–	–
Сахароза / sucrose	+	+	–	+
Маннит / mannitol	–	–	–	–
Манноза / mannose	+	–	+	–
Мальтоза / maltose	–	+	+	+
Фосфатазная активность / Phosphatase activity	+	+	+	+
Лецитиназная активность / Lecithinase activity	+	+	+	+
Протеолитическая активность (разжижение желатины на 3–4-е сутки) / Proteolytic activity (liquefaction of gelatin on days 3–4)	+	+	+	+
Гемолитическая активность (лизис эритроцитов барана) / Hemolytic activity (lysis of ram red blood cells)	+	+	+	+
Чувствительность к сибиреязвенному диагностическому бактериофагу «Гамма A26» / Sensitivity to the anthrax diagnostic bacteriophage “Gamma A26”	–	–	–	–
Тест «жемчужное ожерелье» / The Pearl Necklace Test	–	–	–	–
МФА с сибиреязвенными иммуноглобулинами / FAT with anthrax immunoglobulins	–	–	–	–
ИХА-тест для идентификации спор <i>B. anthracis</i> / LFT for identification of <i>B. anthracis</i> spores	–	–	–	–

+ – положительный результат; – отрицательный результат. / + – positive result; – negative result.

- в геноме отсутствуют одна или обе основные детерминанты вирулентности (плазмиды рОХ1 и рОХ2);
- показатель вирулентности не превышает установленный для вакцинных штаммов (LD₅₀ для белых мышей – >10 спор) [20];

- наличие типичных видовых культурально-морфологических и биохимических свойств;
- отличаются по способности образовывать капсулу в организме теплокровного хозяина и при культивировании на сывороточном агаре;

Таблица 3. **Определение чувствительности штаммов – кандидатов в учебные к антибактериальным препаратам**
 Table 3. **Determination of the sensitivity of candidate strains in training to antibacterial drugs**

Антибактериальный препарат / Antibacterial drug	<i>B. anthracis</i>					<i>B. cereus</i>			
	71/12 (2-я вакцина Ценковского) / (2 nd Tsenkovsky vaccine)	Pasteur (2-я вакцина Пастера) / (2 nd Pasteur vaccine)	Sterne 34 F2	Ихтиман / Ichtiman	СТИ-1 / STI-1	АТСС / ATCC 14579	504	8	var. <i>anthracoides</i> 1312
Ампициллин / <i>ampicillin</i>	S	S	S	I	S	R	R	R	R
Амикацин / <i>amikacin</i>	S	S	S	S	S	S	S	I	I
Амоксиклав / <i>amoxiclav</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Ванкомицин / <i>vancomycin</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Доксициклин / <i>doxycycline</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Окситетрациклин / <i>oxytetracycline</i>	S	S	S	R	S	I	I	I	I
Пиперациллин / <i>piperacillin</i>	I	S	I	R	I	R	R	R	R
Ципрофлоксацин / <i>ciprofloxacin</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Цефуросим / <i>cefuroxime</i>	R	I	R	R	R	R	R	R	R
Цефоперазон / <i>cefoperazone</i>	S	S	S	I	I	I	I	I	I
Хлорамфеникол / <i>chloramphenicol</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Эритромицин / <i>erythromycin</i>	I	I	I	I	I	R	S	S	R

S – чувствительный; R – устойчивый, I – значения МПК с промежуточной устойчивостью находятся между значениями S- и R-культур. / S – sensitive; R – resistant, I – MIC values with intermediate resistance are between the S and R values.

- имеют различные сочетания генов вирулентности *pagA* (плазмида рОХ1) и *capA* (плазмида рОХ2) для демонстрации вариантов детекции с помощью ПЦР;

- выявляются с помощью регламентированных иммунологических методов (МФА, ИХА-тест);

- при заражении лабораторных животных формируют типичные патоморфологические изменения во внутренних органах;

- накапливаются и обеспечивают стабильное выделение бактериальной культуры при посеве на питательные среды проб всех внутренних органов и крови;

- чувствительны к антибактериальным препаратам, применяемым для экстренной профилактики и лечения сибирской язвы [21];

штаммы *B. cereus*

- обладают типичными видовыми биологическими свойствами, актуальными при дифференциации с возбудителем сибирской язвы;

- чувствительны к антибактериальным препаратам, применяемым для экстренной профилактики и лечения сибирской язвы.

С учетом разработанных критериев по данным паспортов были отобраны в качестве кандидатов в учебные 9 штаммов микроорганизмов, депонированных в Государственной коллекции патогенных бактерий (ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб»): *B. anthracis* СТИ-1, *B. anthracis* Sterne 34 F2, *B. anthracis* «Ихтиман», *B. anthracis* 71/12 (2-я вакцина Ценковского), *B. anthracis* Pasteur (2-я вакцина Пастера); *B.*

Таблица 4. **Применение учебных штаммов на практических занятиях**
 Table 4. **Use of training strains in practical classes**

Тема занятия / Lesson Topic	Название штамма / Strain
Изучение морфологических и культуральных особенностей сибиреязвенного микроба / <i>Morphological and cultural features of the anthrax microbe</i>	<i>B. anthracis</i> СТИ-1 / <i>B. anthracis</i> 71/12
Освоение иммунологических методов лабораторной диагностики сибирской язвы (МФА, ИХА-тест) / <i>Immunological methods of laboratory diagnostics of anthrax (FAT, LFT)</i>	<i>B. anthracis</i> СТИ-1
Лабораторная диагностика сибирской язвы с помощью ПЦР / <i>Laboratory diagnostics of anthrax using PCR</i>	<i>B. anthracis</i> СТИ-1 <i>B. anthracis</i> 71/12
Лабораторная диагностика сибирской язвы биологическим методом / <i>Laboratory diagnostics of anthrax using a biological method</i>	<i>B. anthracis</i> СТИ-1 <i>B. anthracis</i> 71/12
Освоение методов идентификации сибиреязвенного микроба / <i>Methods of identifying the anthrax microbe</i>	<i>B. anthracis</i> СТИ-1 <i>B. anthracis</i> 71/12
Дифференциация <i>B. anthracis</i> от близкородственных микроорганизмов, выделяемых из проб клинического материала и объектов окружающей среды / <i>Differentiation of B. anthracis from closely related microorganisms isolated from clinical samples and environmental objects</i>	<i>B. anthracis</i> СТИ-1 <i>B. cereus</i> ATCC 14579
Приготовление проб-имитаторов ПБА для комплексного исследования объектов, подозрительных на наличие возбудителя сибирской язвы в рамках ситуационной задачи. / <i>Preparation of PBA imitator samples for a comprehensive study of objects suspected of having anthrax pathogen within the framework of a situational task</i>	<i>B. anthracis</i> СТИ-1 <i>B. cereus</i> ATCC 14579 <i>E. coli</i> ATCC 25922 <i>S. aureus</i> ATCC 6538 <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853

cereus ATCC 14579, *B. cereus* 504-тип, *B. cereus* 8, *B. cereus* var. *anthracoides* 1312. Проведен анализ биологических свойств, значимых для лабораторной диагностики, регламентированными методами (табл. 1, 2), а также оценка чувствительности к антибактериальным препаратам, применяемым для профилактики и лечения сибирской язвы [17] (табл. 3).

По результатам анализа биологических свойств сформирован набор, включающий авирулентный штамм *B. anthracis* СТИ-1, штамм *B. anthracis* 71/12, обеспечивающие всестороннее изучения вопросов микробиологии и лабораторной диагностики сибирской язвы, а также штамм *B. cereus* ATCC 14579 для освоения дифференцирования сибиреязвенного микроба от близкородственных патогенных для человека бацилл.

На основании данных о вирулентности *in vivo* разработан дифференцированный подход к использованию штаммов *B. anthracis* для снижения вероятности лабораторного инфицирования в ходе приобретения навыков выполнения микробиологических манипуляций при освоении слушателями курсов регламентированных методов индикации и идентификации в рамках учебного модуля «Микробиология и лабораторная диагностика сибирской язвы» (табл. 4). Наиболее безопасный штамм *B. anthracis* СТИ-1 используют для индивидуальной работы слушателей курсов на всех этапах лабораторного исследования.

При изучении морфологических и культуральных особенностей сибиреязвенного микроба *B. anthracis* СТИ-1 демонстрирует свойства штаммов, не формирующих капсулу в организме хозяина и при культивировании на бикарбонатно-сывороточном агаре, а *B. anthracis* 71/12 – штаммов, образующих капсулу.

При освоении метода ПЦР в схеме лабораторной диагностики сибирской язвы на практических занятиях используют штаммы с разным набором видоспецифичных генов: авирулентный вакцинный штамм *B. anthracis* СТИ-1 (содержит ген *pagA* (pXO1⁺) и не имеет ген *capA* (pXO2⁻)) и *B. anthracis* 71/12 (содержит ген *pagA* (pXO1⁺) и ген *capA* (pXO2⁺)).

При освоении биологического метода исследования в схеме лабораторной диагностики сибирской язвы кроме вакцинного используют вирулентный штамм *B. anthracis* 71/12. Данный штамм применяют преподаватели для заблаговременного заражения лабораторных животных с целью демонстрации ярко выраженных патоморфологических изменений подкожной клетчатки и внутренних органов. При посевах на плотные питательные среды из всех внутренних органов и крови животных выделяют культуру возбудителя сибирской язвы.

Для идентификации штаммов данные о типичных морфологических и культуральных свойствах дополняют результатами изучения ряда признаков: подвижность, способность к капсулообразованию *in vitro* и *in vivo*, спорообразование, чувствительность к сибиреязвенным бактериофагам, лецитиназная активность, гемолитическая активность в отношении эритроцитов барана, фосфатазная активность, чувствительность к пенициллину [8, 9, 15]. При изучении алгоритма видовой идентификации возбудителя сибирской язвы на практических занятиях используют бескапсульный авирулентный вакцинный штамм *B. anthracis* СТИ-1 и капсульный *B. anthracis* 71/12.

Освоение методов дифференциации *B. anthracis* от близкородственных микроорганизмов, выделяемых из проб клинического материала и объектов окружающей среды, проводят путем сравнения свойств *B. anthracis* СТИ-1 и *B. cereus* ATCC 14579, обладающего типичными свойствами данной группы. Дифференциацию проводят на основании ряда физиолого-биохимических признаков: а) рост бактериальной культуры на плотных и в жидких питательных средах; б) наличие подвижности при 37°C; в) наличие лецитиназной активности; г) наличие гемолитической активности в отношении эритроцитов барана; д) наличие фосфатазной активности; е) отсутствие чувствительности к сибиреязвенному бактериофагу «Гамма А-26»; ж) отсутствие чувствительности к пенициллину; з) результаты иммунологических реакций (МФА, ИХ-тест) и ПЦР с использованием имеющих государственную регистрацию наборов реагентов для выявления и идентификации возбудителя сибирской язвы [8, 9, 15].

Учитывая тематический план учебного модуля «Микробиология и лабораторная диагностика сибирской язвы», целесообразно включить в учебный набор штаммы *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (IV группы патогенности) в качестве «фоновых» микроорганизмов для приготовления проб-имитаторов ПБА-объектов окружающей среды (воды поверхностных водоемов, почвы, смывов с поверхностей), пищевых продуктов и клинического материала (гнояного отделяемого из карбункула, мокроты, испражнений больного и иное).

Заключение

Таким образом, разработанный учебный набор штаммов бактерий позволяет обеспечить в полном объеме реализацию планов практических занятий, обучающимся самостоятельно на авирулентном вакцинном штамме *B. anthracis* СТИ-1 приобрести навыки работы с возбудителем сибирской язвы и освоить в полном объеме регламентированные методы индикации, идентификации и дифференциации *B. anthracis*. Кроме того, использование авирулентного вакцинного штамма позволяет минимизировать вероятность лабораторного инфицирования обучающихся, тем самым снизить биологический риск практических занятий.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках бюджетного финансирования.

Financial support

The work was carried out within the framework of budgetary financing.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Литература

1. Сибирская язва: актуальные проблемы разработки и внедрения медицинских средств защиты. Руководство для врачей. Под ред. Онищенко ГГ, Дармова ИВ, Борисевича СВ. Изд. 2-е, испр. и доп. Сергиев Посад, 2018.

2. Рязанова АГ, Скударева ОН, Герасименко ДК, Семенова ОВ, Аксенова ЛЮ, Еременко ЕИ, и др. Анализ ситуации по сибирской язве в 2019 г., прогноз на 2020 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2020;2:57-61. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-57-61
3. Рязанова АГ, Скударева ОН, Герасименко ДК, Логвин ФВ, Аксенова ЛЮ, Семенова ОВ, и др. Анализ ситуации по сибирской язве в 2022 г. в мире, прогноз на 2023 г. в Российской Федерации. Проблемы особо опасных инфекций. 2023;2:88-94. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-2-88-94
4. Никифоров ВВ, Сорокина НА. Сибирская язва в Российской Федерации в 2023 году: два случая из практики. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2023;6(28):387-400. DOI: 10.17816/EID623060
5. Куличенко АН, Буравцева НП, Рязанова АГ, Еременко ЕИ. Сибирская язва на Северном Кавказе. Под ред. Куличенко АН. Майкоп: Качество, 2016;14-20.
6. Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней. Приложения 1, 11. СанПиН 3.3686-21 утв. Главным государственным санитарным врачом РФ, 2021.
7. Об утверждении перечня социально значимых заболеваний и перечня заболеваний, представляющих опасность для окружающих: постановление Правительства РФ от 01.12.2004 №715 (изм. 31.01.2021). Режим доступа: <https://base.garant.ru/12137881/> (дата обращения 03.06.2024).
8. Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы. Методические указания МУК 4.2.2413-08. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009;69.
9. Порядок организации и проведения лабораторной диагностики сибирской язвы для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней. Методические указания МУК 4.2.2941-11. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011;55.
10. Воробьев АА, Боев ВВ, Бондаренко ВМ, Гинцбург АЛ. Проблема биотерроризма в современных условиях. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2002;3:3-12.
11. Бактериология. Основы безопасной работы с патогенными биологическими агентами I–II групп: программа профессиональной переподготовки. Саратов, 2021.
12. Бактериология. Инфекционные болезни, требующие проведения мероприятий по санитарной охране территории Российской Федерации: программа повышения квалификации. Саратов, 2021;45.
13. Эпидемиологический надзор за сибирской язвой: программа повышения квалификации. Саратов, 2022;39.
14. Дятлов ИА, Кутырев ВВ, Храмов МВ. Питательные среды для выделения, культивирования и идентификации возбудителей особо опасных инфекций бактериальной природы. М., 2012;206.
15. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: практическое руководство. Под ред. Онищенко ГГ, Кутырева ВВ. Изд. 2-е, перераб. и доп. М.: ЗАО «Шико», 2013.
16. Порядок организации и проведения индикации патогенных биологических агентов, в том числе неустановленного систематического положения. Методические рекомендации МР 3.1.0129-18. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2019;62.
17. Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чумы, сибирской язвы, холеры, туляремии, бруцеллеза, сапа и мелиоидоза) к антибактериальным препаратам: методические указания МУК 4.2.2495-09. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010;59.
18. Российские рекомендации. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Версия 2024-02. Год утверждения: 2024. МАКМАХ, СГМУ: Смоленск, 2024.
19. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 14.0, valid from 2024-01-01. This document should be cited as "The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. *Bacillus* spp. except *B. anthracis*. Available at: https://heiodmed.de/wp-content/uploads/2024/01/Breakpoint_Tables-01.01.2024.pdf (accessed 26.06.2-24).
20. Фармакопейная статья ФС 42 «Вакцина сибиреязвенная комбинированная». ОФС «Иммунобиологические лекарственные средства» 24.09.2013. Режим доступа: <https://base.garant.ru/70457452/236230d7c8d87d8ae97576229da0a012/> (дата обращения 26.06.2024).
21. Инфекционные болезни: национальное руководство. Под ред. Ющука НД, Венгерова ЮЯ. 3-е изд., перераб. и доп. Серия «Национальные руководства». М.: ГЭОТАР-Медиа, 2021;409-420. DOI: 10.33029/9704-6122-8-INB-2021-1-1104

References

1. Sibirskaia yazva: aktual'nye problemy razrabotki i vnedreniya meditsinskikh sredstv zashchity. Rukovodstvo dlya vrachei. Pod red. Onishchenko GG, Darmova IV, Borisevicha SV. Izd. 2-e, ispr. i dop. Sergiev Posad, 2018. (In Russian).
2. Ryzanova AG, Skudareva ON, Gerasimenko DK, Semenova OV, Aksenova LYu, Eremenko EI, et al. Analysis of the Situation on Anthrax in 2019, the Forecast for 2020. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2020;2:57-61. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-57-61 (In Russian).
3. Ryzanova AG, Skudareva ON, Gerasimenko DK, Logvin FV, Aksenova LYu, Semenova OV, et al. Analysis of the Situation on Anthrax in the World in 2022, the Forecast for the Russian Federation for 2023. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2023;2:88-94. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-2-88-94 (In Russian).
4. Nikiforov VV, Sorokina NA. Malignant anthrax in Russian Federation in 2023: two case reports. Epidemiology and Infectious Diseases. 2023;6(28):387-400. DOI: 10.17816/EID623060 (In Russian).
5. Kulichenko AN, Buravtseva NP, Ryzanova AG, Eremenko EI. Sibirskaia yazva na Severnom Kavkaze. Pod red. Kulichenko AN. Maikop: Kachestvo, 2016;14-20. (In Russian).
6. Sanitarно-epidemiologicheskie trebovaniya po profilaktike infektsionnykh boleznei. Prilozheniya 1, 11. SanPiN 3.3686-21 utv. Glavnym gosudarstvennym sanitarnym vrachom RF, 2021. (In Russian).
7. Ob utverzhdenii perechnya sotsial'no znachimykh zabolevanii i perechnya zabolevanii, predstavlyayushchikh opasnost' dlya okruzhayushchikh: postanovlenie Pravitel'stva RF ot 01.12.2004 №715 (izm. 31.01.2021). Available at: <https://base.garant.ru/12137881/> (accessed 03.06.2024). (In Russian).
8. Laboratornaya diagnostika i obnaruzhenie vozбудitelya sibirskoi yazvy. Metodicheskie ukazaniya MUK 4.2.2413-08. M.: Federal'nyi tsentr gigieny i epidemiologii Rospotrebнадзора, 2009;69. (In Russian).
9. Poryadok organizatsii i provedeniya laboratornoi diagnostiki sibirskoi yazvy dlya laboratorii territorial'nogo, regional'nogo i federal'nogo urovnei. Metodicheskie ukazaniya MUK 4.2.2941-11. M.: Federal'nyi tsentr gigieny i epidemiologii Rospotrebнадзора, 2011;55. (In Russian).
10. Vorob'ev AA, Boev BV, Bondarenko VM, Gintsburg AL. Problem of bioterrorism under modern conditions. Journal of Microbiology Epidemiology Immunobiology. 2002;3:3-12. (In Russian).
11. Bakteriologiya. Osnovy bezopasnoi raboty s patogennymi biologicheskimi agentami I–II grupp: programma professional'noi perepodgotovki. Saratov, 2021. (In Russian).
12. Bakteriologiya. Infektsionnye bolezni, trebuyushchie provedeniya meropriyatii po sanitarnoi okhrane territorii Rossiiskoi Federatsii: programma povysheniya kvalifikatsii. Saratov, 2021;45. (In Russian).
13. Epidemiologicheskii nadzor za sibirskoi yazvoi: programma povysheniya kvalifikatsii. Saratov, 2022;39. (In Russian).
14. Dyatlov IA, Kutuyrev VV, Khranov MV. Pitatel'nye sredy dlya vydeleniya, kul'tivirovaniya i identifikatsii vozбудitelei osobo opasnykh infektsii bakterial'noi prirody. M., 2012;206. (In Russian).

15. Laboratornaya diagnostika opasnykh infektsionnykh boleznei: prakticheskoe rukovodstvo. Pod red. Onishchenko GG, Kutyreva VV. Izd. 2-e, pererab. i dop. M.: ZAO «Shiko», 2013. (In Russian).
16. Poryadok organizatsii i provedeniya indikatsii patogennykh biologicheskikh agentov, v tom chisle neustanovlennogo sistematicheskogo polozeniya. Metodicheskie rekomendatsii MR 3.1.0129-18. M.: Federal'naya sluzhba po nadzoru v sfere zashchity prav potrebiteli i blagopoluchiya cheloveka, 2019;62. (In Russian).
17. Opredelenie chuvstvitel'nosti vozbuditelei opasnykh bakterial'nykh infektsii (chumy, sibirskoi yazvy, kholery, tulyaremii, brutselleza, sapa i melioidoza) k antibakterial'nym preparatam: metodicheskie ukazaniya MUK 4.2.2495-09. M.: Federal'nyi tsentr gigieny i epidemiologii Rospotrebnadzora, 2010;59. (In Russian).
18. Rossiiskie rekomendatsii. Opredelenie chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antimikrobnym preparatam. Versiya 2024-02. God utverzhdeniya: 2024. MAKMAX, SGMU: Smolensk, 2024. (In Russian).
19. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 14.0, valid from 2024-01-01. This document should be cited as "The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. *Bacillus* spp. except *B. anthracis*. Available at: https://heiiromed.de/wp-content/uploads/2024/01/Breakpoint_Tables-01.01.2024.pdf (accessed 26.06.2-24). (In Russian).
20. Farmakopeinaya stat'ya FS 42 «Vaktsina sibireyazvennaya kombinirovannaya». OFS «Immunobiologicheskie lekarstvennye sredstva» 24.09.2013. Available at: <https://base.garant.ru/70457452/236230d7c8d87d8ae97576229da0a012/> (accessed 26.06.2024). (In Russian).
21. Infektsionnye bolezni: natsional'noe rukovodstvo. Pod red. Yushchuka ND, Vengerova YuYa. 3-e izd. pererab. i dop. Seriya «Natsional'nye rukovodstva». M.: GEOTAR-Media Publ., 2021;409-420. DOI: 10.33029/9704-6122-8-INB-2021-1-1104 (In Russian).

Информация о соавторах:

Малюкова Татьяна Анатольевна, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник отдела образовательных программ и подготовки специалистов ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Попов Юрий Алексеевич, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник отдела образовательных программ и подготовки специалистов ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Ляшова Ольга Юрьевна, научный сотрудник отдела Государственная коллекция патогенных бактерий ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Tatiana A. Malyukova, MD, PhD, Leading Researcher of the Department of Educational Programs and Specialist Training, Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of the Rospotrebnadzor

Yury A. Popov, PhD, DSc (Biological Sciences), Professor, chief researcher of the Department of Educational Programs and Specialist Training, Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of the Rospotrebnadzor

Olga Yu. Lyashova, researcher at the Department of Educational Programs and Specialist Training, Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of the Rospotrebnadzor

НОВОСТИ НАУКИ**ChIP-mini: протокол ChIP-exo с низким уровнем входных данных для выяснения динамики связывания ДНК-белков во внутриклеточных патогенах**

Геномная идентификация профилей связывания для ДНК-связывающих белков из ограниченного числа внутриклеточных патогенов в исследованиях инфекций имеет решающее значение для понимания вирулентности и клеточных процессов, но остается сложной задачей, поскольку текущий ChIP-exo разработан для бактериальных клеток с высоким входным уровнем ($>10^{10}$). Разработан оптимизированный метод ChIP-mini, низковходной ChIP-exo, использующий в 5000 раз меньшее количество исходных бактериальных клеток и аналитический конвейер, для определения динамики связывания ДНК-связывающих белков в патогенах, инфицированных хозяином, по всему геному. Применяя ChIP-mini к внутриклеточным *Salmonella Typhimurium*, идентифицировали 642 и 1837 сайтов связывания H-NS и RpoD соответственно, выявив изменения в их позиции связывания и интенсивности связывания во время инфекции. После заражения наблюдали 21 значительное снижение связывания H-NS в межгенных областях, обнажая промоторную область генов вирулентности, таких как в островах патогенности *Salmonella-2*, 3 и эффлекторах. Кроме того, выявили важный феномен, заключающийся в том, что новые и значительно увеличенные связывания RpoD были обнаружены в областях, демонстрирующих уменьшенное связывание H-NS, тем самым способствуя существенной регуляции генов вирулентности. Эти результаты значительно расширяют понимание того, как H-NS и RpoD одновременно координируют инициацию транскрипции генов вирулентности в макрофагах. Эта работа демонстрирует широко адаптируемый инструмент, который позволит выяснить динамику связывания ДНК-белков у различных внутриклеточных патогенов во время инфекции.



Park JY, Jang M, Choi E, Lee SM, Bang I, Woo J, et al.

ChIP-mini: a low-input ChIP-exo protocol for elucidating DNA-binding protein dynamics in intracellular pathogens. *Nucleic Acids Res.* 2025 Jan 24;53(3):gkaf009. DOI: 10.1093/nar/gkaf009