

Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование
Российской Федерации

3.1. ПРОФИЛАКТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ
4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ
И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

**ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР, ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА
И ПРОФИЛАКТИКА СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ**

Методические указания
МУ 3.1/4.2. *4135* -25

Москва 2025

Эпидемиологический надзор, лабораторная диагностика и профилактика сибирской язвы. МУ 3.1/4.2. 4135-25

1. Разработаны Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Очкасова Ю.В., Скударева О.Н., Трескин А.А.); ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора (Куличенко А.Н., Рязанова А.Г., Еременко Е.И., Буравцева Н.П., Аксенова Л.Ю., Семенова О.В., Герасименко Д.К., Головинская Т.М., Печковский Г.А., Пономаренко Д.Г., Ракитина Е.Л.); ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора (Кутырев В.В., Щербакова С.А., Осина Н.А., Портенко С.А., Карнаузов И.Г., Шарова И.Н., Абдрашитова А.С., Казакова Е.С., Чумачкова Е.А., Дмитриева Л.Н.); ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (Балахонов С.В., Дугаржапова З.Ф., Кравец Е.В.); ФКУЗ «Противочумный центр» Роспотребнадзора (Иванова С.М., Иванников В.В., Лопатин А.А.); ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (Дятлов И.А., Маринин Л.И., Тимофеев В.С., Мокриевич А.Н., Тюрин Е.А., Храмов М.В.); ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (Акимкин В.Г., Чеканова Т.А., Локтионова М.Н.); ФБУЗ ФЦГиЭ Роспотребнадзора (Транквилевский Д.В.); ФГБНУ ФИЦВиМ (Колбасов Д.В., Селянинов Ю.О., Егорова И.Ю.); ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России (Логвин Ф.В.).

2. Утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А.Ю. Поповой «11» август 2025 г.

3. МУ 3.1/4.2. 4135-25 введены взамен МУК 4.2.2413-08 «Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы», утвержденных руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 29.07.2008; МУК 4.2.2941-11 «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики сибирской язвы для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней», утвержденных руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей

и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 14.07.2011; главы 7 МУК 4.2.2495-09 «Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллез, сап, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам», утвержденных руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 01.04.2009; пункта 6.5 МУ 3.3.2.2124-06 «Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза», утвержденных руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 17.08.2006; Методических рекомендаций по использованию этилового спирта с 3 % перекиси водорода для фиксации на предметном стекле возбудителя сибирской язвы, утвержденных заместителем начальника Главного управления карантинных инфекций Минздрава СССР 01.06.1984; Методических рекомендаций по отбору проб почвы для бактериологического исследования на наличие возбудителей сибирской язвы и актиномицетов-антагонистов, утвержденных заместителем начальника Главного управления карантинных инфекций Минздрава СССР 27.09.1984; Методических рекомендаций по использованию 0,05 – 0,1 % раствора Твина-80, как разводящей жидкости, для определения концентрации спор сибирезвездного микроба, утвержденных заместителем начальника Главного управления карантинных инфекций Минздрава СССР 1986; Методических рекомендаций по определению гемолитической активности у сибирезвездного микроба, утвержденных заместителем начальника Главного эпидемиологического управления Минздрава СССР 12.05.1989.

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации



А.Ю. Попова

А.Ю. Попова

«11» *август* 2025 г.

Дата введения «11» *август* 2026 г.

3.1. ПРОФИЛАКТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ
4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ
И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

**ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР, ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА
И ПРОФИЛАКТИКА СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ**

Методические указания
МУ 3.1/4.2. *4135* -25

I. Область применения

1.1. Настоящие методические указания (далее – МУ) описывают алгоритм организации и проведения эпидемиологического надзора, лабораторной диагностики, идентификации сибиреязвенного микроба и профилактики сибирской язвы.

1.2. Настоящие МУ предназначены для специалистов органов и организаций, осуществляющих федеральный государственный санитарно-эпидемиологический контроль (надзор), а также могут быть использованы специалистами органов исполнительной власти субъектов Российской Федерации в сфере охраны здоровья и медицинских организаций (далее – МО), осуществляющих отбор биологического материала от лиц с подозрением на сибирскую язву, организаций, входящих в Государственную ветеринарную службу Российской Федерации (далее – Государственная ветеринарная служба, организации ветеринарной службы), научно-исследовательских учреждений и других заинтересованных ведомств.

II. Общие положения

2.1. Сибирская язва (Anthrax) представляет собой острую особо опасную зоонозную бактериальную инфекционную болезнь, возбудитель которой относится ко II группе патогенности¹.

2.2. Резервуаром возбудителя сибирской язвы и основным фактором поддержания эпизоотического процесса служит почва. Заражение животных происходит главным образом алиментарным (через корм и питьевую воду, инфицированные спорами), инокуляционным (через укусы кровососущих насекомых), воздушно-пылевым (через аэрозоли) путями, в результате контакта с контаминированными возбудителем почвой, подстилкой. Животные в течение всего периода болезни выделяют возбудитель с мочой, испражнениями и слюной во внешнюю среду, в том числе в почву.

2.3. Основным источником инфекции для человека являются больные домашние (например, крупный и мелкий рогатый скот, лошади, ослы, олени, верблюды, свиньи) и дикие травоядные животные. Среди диких животных наиболее чувствительны к инфекции: лоси, горные бараны, косули, зубры, дикие кабаны, антилопы, жирафы; малочувствительны плотоядные: лисицы, шакалы, койоты, птицы (например, грифы, ястребы, кобчики); нечувствительны: пресмыкающиеся, земноводные, рыбы, беспозвоночные. Люди заражаются сибирской язвой преимущественно в результате контакта с больными животными при уходе, вынужденном убое скота и разделке туш, при контакте с трупами павших животных, сырьем и продукцией животноводства, при употреблении в пищу мяса, мясных и прочих продуктов от больных (павших) животных. Возможно также заражение через укусы кровососущих насекомых, контаминированную почву и при вдыхании содержащего споры аэрозоля. Значительную эпизоотическую и эпидемическую опасность представляют почвенные очаги сибирской язвы как естественные резервуары сибиреязвенной инфекции: сибиреязвенные захоронения (далее – СЯЗ) и «морозные поля» – значительные по площади, без четких границ территории, на которых в прошлом наблюдался массовый падеж животных, связанный с эпизоотиями сибирской язвы. Возникновение заболевания возможно также при нарушениях противоэпидемического режима и правил биологической безопасности в бактериологических лабораториях и использовании сибиреязвенного микроба в качестве агента при биотеррористических актах.

2.4. Больной человек не является звеном в поддержании жизненного цикла сибиреязвенного микроба, случаи передачи сибиреязвенной инфекции от человека к человеку крайне редки, описаны единичные факты заражения в

¹ Пункт 1004 СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», утвержденных постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2021 № 4 (зарегистрировано Минюстом России 15.02.2021, регистрационный № 62500), с изменениями, внесенными постановлениями Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 11.02.2022 № 5 (зарегистрировано Минюстом России 01.03.2022, регистрационный № 67587); от 25.05.2022 № 16 (зарегистрировано Минюстом России 21.06.2022, регистрационный № 68934) (далее – СанПиН 3.3686-21).

результате непосредственного контакта с очагами поражения кожи и отделяемым при кожной форме сибирской язвы.

Преимущественным механизмом передачи возбудителя сибирской язвы у людей является контактный (более 90 %), который реализуется при прямом соприкосновении человека с источником возбудителя инфекции, главным образом с больными животными или их трупами. Фекально-оральный механизм передачи реализуется алиментарным путем при употреблении сырой, термически необработанной (недостаточно обработанной) продукции животноводства, содержащей инфицирующую дозу возбудителя. Аспирационный механизм передачи возбудителя реализуется воздушно-пылевым путем. Возможна трансмиссивная передача возбудителя, которая реализуется при укусах инфицированными кровососущими членистоногими, а также инъекционная при введении контаминированных возбудителем веществ.

2.5. В структуре заболеваемости выделяют эпидемиологические типы: профессионально-сельскохозяйственный (встречается у пастухов, животноводов и ветеринаров), профессионально-индустриальный (наблюдается у лиц, работающих на кожевенных, щетиношерстных, шерстеобрабатывающих производствах) и бытовой (возникает при вынужденном убое, разделке туш, кулинарной обработке, реализации и употреблении зараженного мяса и мясных продуктов, возможен при ношении меховой и кожаной одежды из инфицированных материалов, использовании инфицированных кисточек для бритья, обработке шкур и шерсти в домашних условиях и пр.).

2.6. Различают следующие формы заболевания: кожная, легочная (ингаляционная), ротоглоточная (орофарингеальная), желудочно-кишечная (гастроинтестинальная), инъекционная, первичная септическая формы сибирской язвы, возникновение которых зависит от путей заражения. Возможно осложнение в виде генерализации инфекции с развитием вторичного сибиреязвенного сепсиса, инфекционно-токсического шока и сибиреязвенного менингита.

2.7. Сибирская язва (A22) относится к подклассу «Некоторые бактериальные зоонозы» (A20 – A28) класса I «Некоторые инфекционные и паразитарные заболевания» (A00 – B99)². Различают следующие клинические формы:

- A22.0 – кожная форма сибирской язвы;
- A22.1 – легочная форма сибирской язвы;
- A22.2 – желудочно-кишечная форма сибирской язвы;
- A22.7 – сибиреязвенный сепсис;
- A22.8 – другие формы сибирской язвы;
- сибиреязвенный менингит (G01);
- A22.9 – сибирская язва неуточненная.

2.8. Развитие постинфекционного иммунитета определяется тяжестью перенесенного заболевания. Постинфекционный иммунитет вырабатывается при тяжелом течении сибиреязвенной инфекции, при среднетяжелом и легком течении инфекционного процесса иммунитет вырабатывается неустойчивый, в связи с чем возможны повторные заражения.

² Международная классификация болезней МКБ-10 – mkb-10.com/index.php?pid=133 (в свободном доступе).

2.9. Возбудитель сибирской язвы может быть использован как биологическое оружие категории А (I) с высокой вероятностью его применения при биологических террористических атаках. Поэтому своевременная и точная лабораторная диагностика сибирской язвы приобретает особое значение.

Краткие сведения о возбудителе сибирской язвы

2.10. Возбудитель сибирской язвы – *Bacillus* (далее – *B.*) *anthracis* – относится к семейству спорообразующих микроорганизмов *Bacillaceae*, роду *Bacillus*. В роду *Bacillus*, насчитывающем свыше 200 видов, выделяют группу *Bacillus cereus* (или *Bacillus cereus sensu lato*), которая в настоящее время объединяет *B. anthracis* и близкородственные бациллы *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weichenstephanensis*, *B. wiedmannii*, *B. cytotoxicus*, *B. toyonensis*, *B. manliponensis*, *B. bingmayongensis*, *B. gaemokensis*. По принятой в Российской Федерации классификации патогенных биологических агентов (далее – ПБА), возбудитель сибирской язвы относится к микроорганизмам II группы патогенности³.

2.11. *B. anthracis* – грамположительная спорообразующая неподвижная крупная палочка. В зависимости от стадии развития культуры, а также условий окружающей среды возбудитель сибирской язвы может существовать в трех формах – капсульной вегетативной, бескапсульной вегетативной и споровой.

В мазках из культур, выросших на питательных средах, палочки (размеры 1,0 – 1,5 × 6,0 – 10,0 мкм) расположены длинными цепочками, концы микробов в окрашенных препаратах обрублены, и цепочка напоминает бамбуковую трость с коленчатыми сочленениями. В мазках-отпечатках из патологического материала палочки расположены одиночно, попарно или короткими цепочками, окружены хорошо выраженной капсулой, зачастую общей для группы микробных клеток.

2.12. В условиях окружающей среды при свободном доступе кислорода, дефиците питательных веществ, определенной влажности, нейтральной или слабощелочной среде, при температуре плюс 12 – 42 °С (оптимально плюс 26 – 37 °С) вегетативные формы *B. anthracis* преобразуются в высокоустойчивые споры, способные неопределенно долгое время сохраняться в окружающей среде, в том числе в почве. В каждой вегетативной клетке (спорангии) образуется одна спора, располагающаяся центрально, ее диаметр не превышает ширину тела микробной палочки. Споры имеют овальную форму размером 0,8 – 1,0 × 1,2 – 1,5 мкм.

Процесс спорообразования состоит из четырех основных стадий: подготовительной, образования проспор, готовых спор и зрелых спор. Спорогенез зависит от особенностей штамма, наличия тех или иных питательных веществ, рН среды, температуры выращивания, влажности и др. В живом организме и в нескрытых трупах споры не образуются.

При попадании спор в благоприятные условия, такие как наличие необходимых питательных веществ, высокая влажность, оптимальная температура, из них в течение нескольких ч образуются вегетативные клетки.

³ Приложение 1 СанПиН 3.3686-21.

2.13. В зависимости от биологической формы существования возбудитель сибирской язвы обладает различной устойчивостью к воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды. Вегетативные формы малоустойчивы к температурным факторам: при температуре плюс 50 – 55 °С они погибают через 40 – 60 мин, при кипячении – мгновенно. Растворы дезинфицирующих веществ в спорцидных концентрациях разрушают вегетативные клетки в течение нескольких мин.

В споровой форме сибирезвенный микроб высоко устойчив к температурному воздействию, высушиванию, ультрафиолетовым лучам, дезинфицирующим средствам и другим физическим и химическим факторам.

Споры возбудителя отличаются исключительной устойчивостью. Они остаются жизнеспособными при воздействии низких температур – замораживание в жидком азоте (минус 196 °С) не нарушает их жизнедеятельности. Споры выдерживают кипячение в воде до 30 мин, действие текучего пара – до 12 мин, сухого жара при температуре плюс 120 °С – до 2 ч. Прямой солнечный свет убивает споры в течение 4 – 20 суток. Споры *B. anthracis* устойчивы к действию этилового спирта.

Режимы обеззараживания материала, содержащего возбудитель сибирской язвы, определены санитарно-эпидемиологическими требованиями к обеспечению безопасности при работе с микроорганизмами I – IV групп патогенности⁴.

2.14. Сибирезвенный микроб – факультативный анаэроб, оптимальная температура роста плюс 34 – 37 °С, оптимальное значение рН (7,2 – 7,8), не обладает подвижностью, хорошо растет на обычных питательных средах – мясopептонном бульоне и агаре (далее – МПБ и МПА), бульоне и агаре Хоттингера. Характер роста в совокупности с другими признаками учитываются при идентификации.

При посевах на чашки Петри с питательным агаром после 18 – 24 ч инкубации при температуре плюс (36 ± 1) °С микроб формирует крупные шероховатые сухие матовые колонии в R-форме, с «шагреновой» поверхностью, с неровными краями и отходящими от них волнистыми отростками. При малом увеличении под микроскопом (7 × 10) они напоминают локоны волос или львиную гриву.

В жидких питательных средах после 18 – 24 ч инкубации при температуре плюс (36 ± 1) °С характерен придонный рост сибирезвенного микроба в виде «комочка ваты», с трудом разбивающегося при встряхивании, при этом бульон остается прозрачным.

Сибирезвенный микроб способен разлагать с образованием кислоты без газа глюкозу, мальтозу, сахарозу, но не разлагает лактозу, арабинозу, маннит. Обладает относительно низкой протеолитической активностью и при посеве уколом в столбик 10 – 12 % мясopептонного желатина и выращивании при температуре плюс 22 °С рост микроба напоминает елочку, опрокинутую верхушкой вниз; на 3 – 5 день желатин разжижается в виде воронки. Большинство сапрофитов полностью разжижает желатин в более короткие сроки. При росте *B. anthracis* на кровяном агаре с 3 – 5 % дефибрированной крови барана через

⁴ Таблица 6 приложения 2 СанПиН 3.3686-21.

20 – 24 ч гемолиз, как правило, не наблюдается (может проявляться лишь у отдельных штаммов сибиреязвенного микроба), в то время как многие сапрофиты дают быстрый гемолиз (через 12 – 18 ч при температуре плюс $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$). Большинство штаммов сибиреязвенного микроба не образует фермент лецитиназу. При росте на агаре с куриным желтком или лецитином вокруг колоний не происходит помутнения среды в виде беловатой зоны, а при посеве на жидкую желточную среду желток не свертывается даже при 5 – 6-суточном инкубировании. Сапрофиты свертывают желток в течение 6 – 10 ч. Сибиреязвенный микроб, в отличие от сапрофитных бацилл, обладает низкой фосфатазной активностью и не способен разлагать фосфаты, добавляемые в питательную среду (тест на фосфатазу). При этом некоторые штаммы сибиреязвенного микроба могут проявлять фосфатазную активность.

До 95 % штаммов сибиреязвенного микроба лизируется сибиреязвенными бактериофагами «Гамма», «К» R/D-Ph-6 и Fah-ВНИИВВиМ.

2.15. Возбудитель сибирской язвы чувствителен к большинству антибактериальных препаратов: пенициллинам, цефалоспорином I поколения, тетрациклинам, фторхинолонам, рифампицину, аминогликозидам. Пенициллин способен задерживать развитие сибиреязвенного микроба даже при низкой концентрации в питательной среде. К отдельным макролидам сибиреязвенный микроб умеренно устойчив, обладает устойчивостью к цефалоспорином III и некоторым цефалоспорином II поколения. Описаны редко встречающиеся резистентные штаммы *B. anthracis*, в основном с устойчивостью к пенициллинам.

2.16. Возбудитель сибирской язвы обладает почти универсальной патогенностью для млекопитающих – человека и других приматов, сельскохозяйственных и диких животных, лабораторных животных.

Основными факторами патогенности у микроба являются капсула и экзотоксины. Сибиреязвенный микроб образует их в инфицированном макроорганизме или при культивировании на искусственных питательных средах в определенных условиях.

Наличие капсулы необходимо на первых этапах инфекционного процесса для предотвращения опсонизации и фагоцитоза микроорганизма.

Типичные вирулентные штаммы *B. anthracis* образуют капсулу в организме больных людей и животных, а также при культивировании на 1 % бикарбонатно-сывороточном агаре или аналогичных средах в атмосфере, содержащей 5 – 50 % углекислого газа (далее – CO_2). На 1 % бикарбонатно-сывороточном агаре микроб растет в SM-форме в виде гладких, блестящих, влажных, слизистых колоний с неровными краями.

Экзотоксины играют ведущую роль в патогенезе сибиреязвенной инфекции и формировании специфического иммунитета. Сибиреязвенные экзотоксины относятся к бинарным двухкомпонентным белковым токсинам АВ-типа и обладают двумя разными биологическими активностями. Компонентами токсинов являются отечный фактор (далее – ОФ), летальный фактор (далее – ЛФ) и протективный антиген (далее – ПА) – белки с молекулярными массами 89, 85 и 83 кДа, соответственно. В отечном токсине (ОФ + ПА) и летальном токсине (ЛФ + ПА) эффекторную функцию выполняют ОФ и ЛФ (А-субъединицы), а акцепторную и интернализирующую функции – ПА (В-субъединица). ЛФ,

являющийся цинк-зависимой металлопротеазой, повреждает митоген-активируемые протеинкиназы путем протеолитического расщепления, что приводит к избыточному высвобождению цитокинов, апоптозу и, в конечном итоге, к некрозу и гипоксии. ОФ, представляющий собой высокоэффективную кальмодулин-зависимую аденилатциклазу, преобразует АТФ в ц-АМФ, которая приводит к снижению концентрации ионов хлора и выраженному увеличению оттока воды из пораженных клеток, что обуславливает развитие массивного отека тканей. На начальных этапах инфекции ЛФ и ОФ воздействуют на макрофаги и нейтрофилы, приводя к нарушениям функционирования иммунной системы организма хозяина и способствуя прогрессированию инфекционного процесса. Аккумуляция в тканях и воздействие токсинов на центральную нервную систему приводят к летальному исходу на фоне легочной недостаточности и гипоксии.

2.17. Геном возбудителя сибирской язвы представлен кольцевой хромосомой размером ~ 5,2 – 5,5 млн пар нуклеотидов (далее – п.н.), плазмидами рХО1 (~ 182 тыс. п.н.) и рХО2 (~ 94 – 96 тыс. п.н.). Токсинообразование и капсулообразование детерминированы плазмидами рХО1 и рХО2, соответственно. Отсутствие хотя бы одной из этих плазмид приводит к снижению вирулентности вплоть до полной ее утраты.

2.18. Наряду с «классическими», встречаются атипичные сибирезвенные штаммы, отличающиеся от типовых штаммов по плазмидному составу, морфологии колоний, капсулообразованию, вирулентности, фосфатазной, лецитиназной и гемолитической активности, чувствительности к бактериофагу и антибактериальным препаратам.

III. Эпидемиологический надзор за сибирской язвой

3.1. В рамках эпидемиологического надзора за сибирской язвой проводится комплексное динамическое наблюдение за эпидемическим и эпизоотическим процессом сибирской язвы, целью которого является оценка ситуации, разработка адекватных санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий и принятие управленческих решений, направленных на недопущение формирования эпидемических очагов и распространения инфекции.

3.2. Эпидемиологический надзор за сибирской язвой проводится органами, осуществляющими федеральный государственный санитарно-эпидемиологический контроль (надзор)⁵.

3.3. Эпидемиологический надзор за сибирской язвой включает:

– мониторинг заболеваемости и оценку эпидемиологической ситуации, учет и эпидемиологическое расследование каждого случая сибирской язвы среди людей;

– анализ эпизоотологической ситуации по сибирской язве по данным государственной ветеринарной службы, включая анализ комплекса ветеринарно-санитарных мероприятий, направленных на предупреждение заболевания животных и недопущение распространения инфекции;

⁵ Глава XI СанПиН 3.3686-21; положение об эпидемиологическом мониторинге за инфекционными и паразитарными болезнями, утвержденное руководителем Роспотребнадзора 28.11.2023.

- оценку эффективности проводимых санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий;

- контроль недопущения проведения работ, связанных с выемкой и перемещением грунта в границах СЯЗ и СЗЗ без обоснованной необходимости их осуществления (например, аварийно-ремонтные работы) и согласования с органом, уполномоченным осуществлять федеральный государственный санитарно-эпидемиологический контроль (надзор);

- мониторинг за циркуляцией возбудителя, выявление, учет, паспортизация и постоянное слежение за проявлением активности стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов (далее – СНП);

- составление и актуализацию баз данных СНП, почвенных очагов сибирской язвы (СЯЗ, «морových полей») и постоянный обмен информацией между заинтересованными органами об эпидемических и эпизоотических проявлениях сибирской язвы на данной территории;

- ранжирование территорий субъектов Российской Федерации по степени потенциального риска осложнения эпизоотолого-эпидемиологической ситуации по сибирской язве с целью обоснованного формирования плана проведения санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий;

- контроль проведения профилактической вакцинации лицам, профессиональная деятельность которых связана с риском заражения сибирской язвой;

- участие в проведении информационно-разъяснительной работы с населением;

- прогнозирование тенденций развития эпидемиологической ситуации.

3.4. В рамках мониторинга заболеваемости сибирской язвой проводится оперативный и ретроспективный эпидемиологический анализ, основными задачами которого являются своевременное выявление предпосылок, причин и признаков осложнения эпидемиологической ситуации для осуществления оперативного реагирования.

3.5. Оперативный анализ проводится при осложнении эпидемиологической ситуации на конкретной территории (ежедневный анализ) на основании экстренных извещений о выявлении больного или лица с подозрением на заболевание сибирской язвой⁶. По результатам оперативного анализа формулируется предварительный эпидемиологический диагноз с целью организации и проведения санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий, краткосрочного прогнозирования развития эпидемиологической ситуации.

Референс-центром по мониторингу за возбудителем сибирской язвы на базе ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора (далее – Референс-центр по мониторингу за возбудителем сибирской язвы) проводится

⁶ Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 04.02.2016 № 11 «О предоставлении внеочередных донесений о чрезвычайных ситуациях санитарно-эпидемиологического характера» (зарегистрировано Минюстом России 24.03.2016, регистрационный № 41525), с изменениями, внесенными постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 20.04.2016 № 48 (зарегистрировано Минюстом России 11.05.2016, регистрационный № 42072).

еженедельный оперативный анализ эпидемиологической и эпизоотологической ситуации по сибирской язве в мире⁷.

3.6. Ретроспективный анализ эпидемиологической ситуации по сибирской язве (ежемесячный и ежегодный) предусматривает характеристику уровня и динамики заболеваемости с определением тенденций (рост, снижение, стабилизация) в разрезе регионов (субъектов) по возрасту, полу, месту жительства, отношению к социальным и профессиональным группам и включает:

- анализ ежемесячного и ежегодного уровней заболеваемости сибирской язвой людей⁸;

- анализ факторов риска, включая сведения об эпизоотологической ситуации по сибирской язве на административных территориях;

- сравнение показателей заболеваемости со среднемноголетними данными за период не менее 10 лет;

- оценку внутригодового распределения заболеваемости;

- анализ заболеваемости по отдельным территориям;

- оценку охвата вакцинацией и ревакцинацией контингентов профессионального риска заражения сибирской язвой⁹;

- анализ результатов лабораторных исследований на сибирскую язву;

- анализ результатов углубленного изучения выделенных культур возбудителя сибирской язвы с использованием современных методов исследования, в том числе результатов геномного анализа штаммов.

3.7. По результатам ретроспективного анализа формулируются выводы (эпидемиологический диагноз), среднесрочный и долгосрочный прогнозы развития эпидемиологической ситуации, рекомендации и предложения по комплексу санитарно-противоэпидемиологических (профилактических) мероприятий, направленных на обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения по сибирской язве в Российской Федерации.

Референс-центром по мониторингу за возбудителем сибирской язвы осуществляется ежегодный ретроспективный анализ эпидемиологической и эпизоотологической ситуации по сибирской язве в мире с выводами по результатам его проведения¹⁰.

⁷ Приказ Роспотребнадзора от 20.02.2020 № 107 «О мониторинге эпидемиологических рисков в зарубежных странах и предоставлении информации»; приказ Роспотребнадзора от 01.12.2017 № 1116 «О совершенствовании системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации» (далее – приказ Роспотребнадзора от 01.12.2017 № 1116).

⁸ Приказ Росстата от 13.12.2024 № 639 «Об утверждении форм федерального статистического наблюдения № 1 и № 2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях» и указаний по их заполнению».

⁹ Приказ Росстата от 30.12.2020 № 867 «Об утверждении форм федерального статистического наблюдения с указаниями по их заполнению для организации Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека федерального статистического наблюдения за санитарным состоянием субъекта Российской Федерации».

¹⁰ Приказ Роспотребнадзора от 01.12.2017 № 1116.

IV. Организация лабораторной диагностики сибирской язвы

4.1. Лабораторная диагностика сибирской язвы осуществляется в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями¹¹ в рамках системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации¹².

4.2. Учреждения, на лабораторной базе которых могут проводиться исследования на сибирскую язву, должны иметь лицензию на осуществление деятельности, связанной с использованием возбудителей II–IV групп патогенности (опасности)¹³. Лаборатории, осуществляющие исследования на сибирскую язву, должны иметь санитарно-эпидемиологическое заключение о соответствии условий выполнения работ с ПБА II группы (*B. anthracis*) санитарно-эпидемиологическим требованиям¹⁴.

4.3. Исследования на сибирскую язву могут выполнять специалисты не моложе 18 лет с высшим и средним, например, медицинским, биологическим образованием, имеющие дополнительную подготовку по направлениям, отвечающим требованиям и характеру выполняемых работ, не имеющие медицинских противопоказаний к работе с опасными и вредными производственными факторами¹⁵ и имеющие допуск к работе с ПБА II–IV групп на основании приказа руководителя учреждения¹⁶.

4.4. Специалисты, проводящие манипуляции с материалом, подозрительным на содержание возбудителя сибирской язвы, с культурами *B. anthracis*, подлежат вакцинации против сибирской язвы в плановом порядке¹⁷.

4.5. Диагностические исследования с применением молекулярно-генетических методов выполняются на этапах индикации маркеров и идентификации культур возбудителя сибирской язвы в Федеральных бюджетных учреждениях здравоохранения «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъекте Российской Федерации (далее – ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъекте Российской Федерации), Центрах индикации возбудителей инфекционных болезней I – II групп патогенности и обеспечения противоэпидемической готовности, функционирующий на базе противочумного учреждения (далее – Центр индикации), Опорных базах Центров индикации, Центрах секвенирования согласно правилам организации работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I – IV групп патогенности¹⁸.

¹¹ Пункты 1023 – 1034 СанПиН 3.3686-21.

¹² Приказ Роспотребнадзора от 01.12.2017 № 1116.

¹³ Пункт 134 СанПиН 3.3686-21.

¹⁴ Пункт 135 СанПиН 3.3686-21.

¹⁵ Пункт 149 СанПиН 3.3686-21.

¹⁶ Пункт 151 СанПиН 3.3686-21.

¹⁷ Пункты 1098, 1099 СанПиН 3.3686-21.

¹⁸ Приказ Роспотребнадзора от 01.12.2017 № 1116; МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности», утвержденные руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 22.12.2009 (далее – МУ 1.3.2569-09).

4.6. Все работы по отбору проб, учету, хранению, упаковке, передаче, транспортировке образцов материала и выделенных культур, пробоподготовке, исследованию образцов биологического материала и из объектов окружающей среды (далее – ООС), изолированных культур осуществляют в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями к обеспечению безопасности при работе с ПБА I – IV групп, порядку учета, хранения, передачи и транспортировки ПБА¹⁹.

Организация лабораторной диагностики сибирской язвы в лабораториях территориального уровня

4.7. На территориальном уровне лабораторная диагностика сибирской язвы у людей проводится в МО, ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъекте Российской Федерации.

В МО, ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъекте Российской Федерации и его филиалах, не имеющих в структуре лаборатории (отдела) особо опасных инфекций (далее – ООИ), осуществляется отбор, упаковка и транспортировка исследуемого материала.

В ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъекте Российской Федерации, имеющих в структуре лаборатории ООИ, проводится как отбор, упаковка и транспортировка проб, так и исследования на наличие возбудителя сибирской язвы.

4.8. В МО производится отбор биологического материала от людей с подозрением на сибирскую язву, больных с любыми формами болезни²⁰ и аутопсийного материала при летальном исходе²¹ в соответствии с п.п. 5.2 – 5.3, 5.11 – 5.21.

4.9. Биологический материал направляется в лабораторию ООИ ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъекте Российской Федерации, при ее отсутствии – в региональный Центр индикации или в лабораторию Опорной базы Центра индикации²². Рекомендуемая форма сопроводительного документа представлена в приложении 1 к настоящим МУ.

4.10. В лабораториях МО не проводятся бактериологические диагностические исследования материала от больных с подозрением на сибиреязвенную инфекцию.

В случае проведения бактериологического исследования материала от больных (трупов) с инфекцией неустановленной этиологии и обнаружения в посевах крупных матовых шероховатых колоний с бахромчатой периферией, схожих по морфологии с колониями возбудителя сибирской язвы, в мазках из которых выявляют крупные грамположительные палочки с обрубленными концами, работа прекращается, в лаборатории проводится заключительная дезинфекция, а объекты с посевами направляются в лабораторию в соответствии с п.п. 4.8 – 4.9.

¹⁹ Глава IV СанПиН 3.3686-21.

²⁰ Пункт 1026 СанПиН 3.3686-21.

²¹ Пункт 1028 СанПиН 3.3686-21.

²² Приказ Роспотребнадзора от 01.12.2017 № 1116.

При выполнении клинико-диагностических исследований материала от лиц с подозрением на сибирскую язву и больных с установленным диагнозом сибирской язвы в МО рекомендуется использовать бесприборные методы исследования (экспресс-тесты, тест-полоски); при применении автоматических анализаторов разрабатываются рабочие инструкции по правилам безопасной работы; по окончании работ проводится заключительная дезинфекция²³.

4.11. В ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъекте Российской Федерации и его филиалах проводится отбор материала из ООС (например, почва, трава, фураж, подстилка, вода), сырья и продукции животного происхождения, кровососущих членистоногих (при необходимости) в соответствии с решением территориального органа, осуществляющего федеральный государственный санитарно-эпидемиологический контроль (надзор)²⁴ и п.п. 5.4 – 5.6, 5.33 – 5.41.

4.12. Упаковка проб материала осуществляется в соответствии с п. 5.7, передача и транспортировка – согласно п.п. 5.8, 5.10.

4.13. Материал направляется в лабораторию ООИ ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъекте Российской Федерации, при ее отсутствии – в Центр индикации или в лабораторию Опорной базы Центра индикации²⁵. Рекомендуемая форма сопроводительного документа представлена в приложении 2 к настоящему МУ.

4.14. В ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъекте Российской Федерации, имеющих в структуре лаборатории ООИ, при осуществлении лабораторной диагностики сибирской язвы проводятся:

– исследования на наличие возбудителя сибирской язвы и его маркеров материала от больных и аутопсийного материала от умерших с подозрением на сибирскую язву, образцов из ООС, продовольственного сырья и продуктов животного происхождения, кровососущих насекомых в соответствии с п.п. 6.1 – 7.30;

– идентификация штаммов возбудителя сибирской язвы основными методами схемы идентификации культур в соответствии с п.п. 8.1 – 8.12.

4.15. При проведении исследований на сибирскую язву в лабораториях ООИ ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъекте Российской Федерации применяются диагностические препараты, указанные в приложении 3 к настоящему МУ, или аналогичные, зарегистрированные и разрешенные для использования на территории Российской Федерации в установленном порядке²⁶. Питательные среды подлежат контролю по биологическим показателям согласно приложению 4 к настоящему МУ.

²³ Пункты 1063, 1065 СанПиН 3.3686-21.

²⁴ Пункт 1030 СанПиН 3.3686-21.

²⁵ Приказ Роспотребнадзора от 01.12.2017 № 1116.

²⁶ Часть 4 статьи 38 Федерального закона от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» (далее – Федеральный закон от 21.11.2011 № 323-ФЗ); постановление Правительства Российской Федерации от 30.11.2024 № 1684 «Об утверждении Правил государственной регистрации медицинских изделий» (далее – постановление Правительства Российской Федерации от 30.11.2024 № 1684).

4.16. Лаборатории ООИ ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъекте Российской Федерации оснащаются следующим оборудованием: боксами микробиологической безопасности (далее – БМБ) II и III классов, оборудованием для пробоподготовки, хранения проб, проведения исследований: например, бактериологическими, биологическими, генодиагностическими (полимеразная цепная реакция (далее – ПЦР) в режиме «реального времени»), иммунологическими методами (метод флуоресцирующих антител (далее – МФА), иммуноферментный анализ (далее – ИФА).

4.17. Культуры, выделенные в лабораториях ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъекте Российской Федерации, с целью подтверждения и дальнейшего изучения направляются в региональный Центр индикации или Референс-центр по мониторингу за возбудителем сибирской язвы²⁷ по согласованию.

Организация лабораторной диагностики сибирской язвы в лабораториях регионального уровня

4.18. На региональном уровне лабораторная диагностика сибирской язвы осуществляется в лабораториях Центров индикации, Опорных баз Центров индикации, обеспечивающих условия и поддержание постоянной готовности для проведения индикации возбудителя сибирской язвы и лабораторной диагностики сибирской язвы силами специалистов Центров индикации (противочумных учреждений)²⁸.

4.19. Порядок организации лабораторной диагностики сибирской язвы для лабораторий Центров индикации (Опорных баз Центров индикации) соответствует порядку организации лабораторной диагностики сибирской язвы для лабораторий ООИ ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъекте Российской Федерации (см. п.п. 4.14 – 4.16)²⁹.

4.20. Культуры, изолированные в лабораториях Центров индикации, с целью их окончательной идентификации и дальнейшего изучения направляются в Референс-центр по мониторингу за возбудителем сибирской язвы.

Организация лабораторной диагностики сибирской язвы в лабораториях федерального уровня

4.21. На федеральном уровне лабораторная диагностика сибирской язвы проводится в лабораториях Референс-центра по мониторингу за возбудителем сибирской язвы и Центров верификации диагностической деятельности, осуществляющих функции государственных коллекций на базе учреждений Роспотребнадзора (далее – Центры верификации; ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, ФБУН «ГНЦ ПМБ»)³⁰.

4.22. Лаборатории Референс-центра по мониторингу за возбудителем

²⁷ Приказ Роспотребнадзора от 01.12.2017 № 1116.

²⁸ Приказ Роспотребнадзора от 01.12.2017 № 1116.

²⁹ Приказ Роспотребнадзора от 01.12.2017 № 1116.

³⁰ Приказ Роспотребнадзора от 01.12.2017 № 1116.

сибирской язвы проводят:

- идентификацию штаммов возбудителя сибирской язвы основными и дополнительными методами схемы идентификации культур согласно п.п. 8.1 – 9.5;
- исследования материала от больных и аутопсийного материала от умерших с подозрением на сибирскую язву, образцов из ООС, продовольственного сырья и продуктов животного происхождения в соответствии с п.п. 6.1 – 7.30³¹.

4.23. Штаммы, выделенные в Референс-центре по мониторингу за возбудителем сибирской язвы и поступившие в Референс-центр для окончательной идентификации, передают в Центры верификации. Передачу и транспортирование осуществляют в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями³².

4.24. Центры верификации осуществляют:

- верификацию результатов лабораторной диагностики сибирской язвы и идентификацию штаммов сибиреязвенного микроба, полученных из Центров индикации и Референс-центра по мониторингу за возбудителем сибирской язвы;
- хранение коллекционных штаммов, охраноспособное и авторское депонирование³³.

4.25. При исследовании штаммов возбудителя сибирской язвы, в том числе с атипичными свойствами, материала от людей, животных и проб из ООС лабораториями Референс-центра по мониторингу за возбудителем сибирской язвы и Центров верификации используется весь комплекс методов, включая современные высокотехнологичные методы бактериологического, иммунологического, молекулярно-биологического анализа с использованием зарегистрированных и экспериментальных серий диагностических препаратов³⁴.

4.26. Лаборатории Референс-центра по мониторингу за возбудителем сибирской язвы и Центров верификации оснащаются следующим оборудованием: БМБ II и III классов, оборудованием для пробоподготовки, хранения проб, проведения исследований бактериологическим, биологическим, молекулярно-биологическими (ПЦР в режиме «реального времени», системы гель-документирования, секвенирование по Сэнгеру, секвенирование нового поколения), иммунологическими (например, МФА, серологические реакции, ИФА) методами, методами масс-спектрометрии, протеомного анализа, проточной цитометрии, иммунохроматографии, биоинформатического анализа³⁵.

V. Материалы для исследования, отбор, упаковка, транспортировка материала

Материалы для исследования

5.1. Материалами для исследования на сибирскую язву являются³⁶:

³¹ Приказ Роспотребнадзора от 01.12.2017 № 1116.

³² Глава IV СанПиН 3.3686-21.

³³ Приказ Роспотребнадзора от 01.12.2017 № 1116.

³⁴ Приказ Роспотребнадзора от 01.12.2017 № 1116.

³⁵ Приказ Роспотребнадзора от 01.12.2017 № 1116.

³⁶ Пункт 1025 СанПиН 3.3686-21.

– от больных людей или от лиц с подозрением на заболевание в зависимости от формы заболевания: материал кожных аффектов (содержимое везикул, отделяемое карбункула, язвы, струпья), мокрота, промывные воды бронхов, спинномозговая жидкость, моча, мазок со слизистой оболочки ротоглотки, мазок из полости носа, рвотные массы, промывные воды желудка, испражнения, экссудаты; кровь отбирают при всех формах сибирской язвы;

– аутопсийный материал от трупа человека: кровь, экссудаты, кусочки органов (например, селезенка, печень, лимфоузлы, легкие);

– материал от животных, больных или подозрительных на заражение: кровь, толстые мазки крови, истечения из носовой полости, образцы фекалий;

– трупный материал от животных без признаков разложения и не подвергшихся антибактериальной терапии: ухо, толстые мазки крови из периферических сосудов, мышечная ткань, кусочки органов (селезенка, печень, измененные части ткани, лимфатические узлы), костный мозг, отечная соединительная ткань, истечения из носовой полости;

– трупный материал от животных с признаками гнилостного разложения: ухо, трубчатая кость;

– кровососущие членистоногие: слепни, москиты, мухи-жигалки, клещи, блохи;

– продовольственное, лекарственное, эндокринное, ферментное, специальное сырье и продукция животного происхождения;

– ООС: например, почва, трава, фураж, подстилка, вода, смывы с поверхностей.

Отбор, упаковка и транспортировка материалов для исследования

5.2. Отбор материала от больных людей и лиц с подозрением на сибирскую язву проводят как до начала специфического лечения, так и в течение всего периода клинических проявлений. Материал отбирают медицинские работники МО, в которую госпитализирован больной, в присутствии и под руководством специалиста лаборатории (отдела) ООИ ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъекте Российской Федерации или противочумного учреждения с соблюдением правил безопасности при работе с материалом, подозрительным на зараженность микроорганизмами I–II групп патогенности³⁷. В случае невозможности быстрого прибытия указанных специалистов отбор материала от больного осуществляют два медицинских работника, один из которых должен быть врач-инфекционист или врач-терапевт (хирург) стационара, подготовленный по вопросам диагностики ООИ, обученный правилам биологической безопасности при работе с материалом, подозрительным на заражение возбудителями инфекционных болезней I–II групп патогенности³⁸.

5.3. В случае необходимости проведения вскрытия трупа человека, которому ранее при жизни был установлен предположительный диагноз «сибирская язва» и не был отобран материал для лабораторного исследования на наличие маркеров возбудителя, секционный материал отбирают медицинские

³⁷ Глава IV СанПиН 3.3686-21.

³⁸ Пункт 1026 СанПиН 3.3686-21.

работники патологоанатомических отделений (Бюро судебно-медицинской экспертизы) в присутствии специалиста лаборатории (отдела) ООИ ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъекте Российской Федерации или противочумного учреждения³⁹.

5.4. Отбор материала из сырья животного происхождения и ООС осуществляется в случаях необходимости установления источника возбудителя инфекции или фактора его передачи, а также для выявления наличия сибиреязвенного микроба на территориях почвенных очагов (СЯЗ, «морových полей») и на прилегающих к СЯЗ территориях, входящих в санитарно-защитную зону (далее – СЗЗ)⁴⁰. Определение необходимости исследования материала, подозрительного на содержание возбудителя сибирской язвы, принимает орган, осуществляющий федеральный государственный санитарно-эпидемиологический контроль (надзор)⁴¹. Отбор и упаковку образцов материала осуществляют организации, имеющие лицензию на проведение работ с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)⁴².

5.5. Отбор проб биологического, патологического материалов от больных или подозрительных на заболевание животных проводят специалисты территориальных организаций ветеринарной службы, подготовленные по вопросам биологической безопасности при работе с материалом, подозрительным на заражение возбудителями инфекционных болезней I – II групп патогенности.

5.6. Отбор кровососущих членистоногих проводит энтомолог (помощник энтомолога, зоолог, инструктор-дезинфектор) ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъекте Российской Федерации и его филиалов или противочумных учреждений. Отбор осуществляется в случаях необходимости установления источника возбудителя инфекции, а также для выявления сибиреязвенного микроба.

5.7. Отбор проб материала осуществляют в лабораторную посуду (например, емкости, пакеты) предпочтительно однократного использования, соответствующую объему проб. Емкости с образцами материала маркируют, обрабатывают снаружи спорицидным дезинфицирующим средством, герметизируют парафинизированной пленкой или другими материалами и упаковывают с соблюдением принципа «тройной» упаковки⁴³. Первичные емкости с пробами помещают внутрь пластикового или металлического вторичного контейнера с завинчивающейся крышкой, выложенного материалом, адсорбирующим влагу (вата, марля), в достаточном количестве для полного впитывания жидкости в случае повреждения первичного контейнера. Также возможно использование пакетов типа «Вихрь-Почта». Вторичный контейнер

³⁹ Пункт 1028 СанПиН 3.3686-21.

⁴⁰ Пункт 1029 СанПиН 3.3686-21.

⁴¹ Пункт 1030 СанПиН 3.3686-21.

⁴² Постановление Правительства Российской Федерации от 25.01.2022 № 46 «О лицензировании деятельности в области использования возбудителей инфекционных заболеваний человека и животных (за исключением случая, если указанная деятельность осуществляется в медицинских целях) и генно-инженерно-модифицированных организмов III и IV степеней потенциальной опасности, осуществляемой в замкнутых системах» (далее – постановление Правительства Российской Федерации от 25.01.2022 № 46).

⁴³ Пункт 524 СанПиН 3.3686-21.

помещают во внешний (третичный) контейнер (термоконтейнер). Для фиксации контейнеров при необходимости используют воздушно-пузырьковую пленку, пакеты типа «Вихрь-Почта» или другие материалы. Контейнер пломбируют или опечатывают, делают надпись: «Верх, осторожно!». Отбор проб проводят в противочумном костюме II типа или утвержденном аналоге⁴⁴.

5.8. В сопроводительном документе к пробам биологического материала указывают сведения о больном (умершем), данные анамнеза заболевания и эпидемиологического анамнеза, вид материала, отобранного для исследования, дату и время отбора материала, условия транспортировки, цель исследования, наименование учреждения, данные лица, направляющего материал, дополнительные сведения в случае необходимости (приложение 1 к настоящим МУ).

В направлении на исследование продовольственного сырья и продуктов животного происхождения, материала из ООС указывают наименование и место отбора пробы, дату и время отбора материала, условия транспортировки, цель исследования, наименование учреждения, данные лица, направляющего материал, при необходимости – дополнительные сведения (приложение 2 к настоящим МУ).

К сопроводительному документу прилагают опись образцов с указанием места отбора каждой пробы и акт передачи образцов для исследования.

5.9. Лица, участвующие в отборе проб из ООС, обрабатывают обувь раствором дезинфицирующего средства в спороцидной концентрации, отправляются к месту стоянки транспорта, где снимают средства индивидуальной защиты (например, защитную одежду, респираторы, перчатки), которые помещают в одноразовый пакет для медицинских отходов класса В и отправляют в дезкамеру или сжигают⁴⁵.

5.10. Транспортировку проб осуществляют нарочными в соответствии с действующими санитарно-эпидемиологическими требованиями по порядку учета, хранения, передачи и транспортировки микроорганизмов I–IV групп патогенности⁴⁶. Пробы биологического материала (от человека и животных) транспортируют с соблюдением «холодовой цепи» в термоконтейнере с охлаждающими элементами при температуре плюс 2 – 8 °С в течение трех суток, при температуре минус 20 °С – в течение недели, при температуре минус 70 °С – в течение одного месяца. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала. Замораживание образцов цельной крови недопустимо⁴⁷. Транспортировка проб из ООС в лабораторию может осуществляться при температуре окружающей среды, при длительной доставке (до пяти суток с момента отбора образцов) – с соблюдением «холодовой цепи» при температуре плюс 2 – 8 °С.

⁴⁴ Приложение 3 СанПиН 3.3686-21.

⁴⁵ Таблица 6 приложения 2 СанПиН 3.3686-21.

⁴⁶ Пункты 512 – 520, 524, 530 СанПиН 3.3686-21.

⁴⁷ Пункт 4.1 приложения 2 МУ 1.3.2569-09.

Отбор материала от человека

5.11. Отбор материала от больного (подозрительного на заболевание) человека проводят в асептических условиях. Вид материала определяется клинической формой болезни.

5.12. Кожный аффект (везикула, карбункул, язва) и кожные покровы вокруг него обрабатывают 70 % этиловым спиртом.

Максимально возможное содержимое аффекта отбирают шприцем однократного использования с тонкой иглой и переносят в одноразовую индивидуальную пластиковую микропробирку объемом до 2 мл с завинчивающейся крышкой или с защелкой.

Отделяемое кожного аффекта снимают с поверхности стерильным тампоном, смоченным 0,9 % раствором натрия хлорида, и переносят в одноразовую индивидуальную пластиковую микропробирку (см. выше).

Фрагменты струпа (корочки) аффекта снимают влажным тампоном или пинцетом, при необходимости используют ножницы, скальпель. Струп помещают в одноразовую индивидуальную пластиковую микропробирку (см. выше). После манипуляции струп обрабатывают 70 % этиловым спиртом.

Смывы с кожных аффектов осуществляют одноразовым зонд-тампоном, смоченным 0,9 % раствором натрия хлорида. Далее зонд-тампон помещают в одноразовую пластиковую микропробирку, содержащую не более 0,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, аккуратно обрезают (обламывают) стержень и закрывают пробирку.

5.13. При всех формах болезни отбирают цельную кровь ввиду возможности стремительной генерализации инфекции. Отбор венозной крови осуществляют в объеме 4 – 6 мл из локтевой вены в пробирку с К2 этилендиаминтетрауксусной кислоты (далее – ЭДТА). Использование в качестве антикоагулянта гепарина недопустимо.

5.14. Для получения сыворотки крови для иммунологических исследований отбирают венозную кровь в объеме 4 – 6 мл в пробирки с активатором образования сгустка. При отсутствии таковых сыворотку крови получают следующим способом: пробирку с кровью оставляют при комнатной температуре на 30 мин, далее аккуратно обводят сгусток стеклянной палочкой, отделяя его от стенок пробирки, после чего образовавшуюся сыворотку переносят в стерильную пробирку с плотно закручивающейся крышкой.

5.15. Мазок из ротоглотки берут при подозрении на орофарингеальную форму болезни сухим одноразовым зонд-тампоном вращательными движениями с поверхности миндалин, небных дужек и задней стенки ротоглотки. После взятия материала зонд-тампон помещают в одноразовую пластиковую микропробирку, содержащую не более 0,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, аккуратно обрезают (обламывают) стержень и закрывают пробирку.

5.16. Мазок из полости носа осуществляют при подозрении на ингаляционное заражение сухим одноразовым зонд-тампоном, который вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2 – 3 см до нижней раковины, затем слегка опускают вниз, далее вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину, производят вращательное движение и удаляют вдоль

наружной стенки носа. После взятия материала зонд-тампон помещают в одноразовую пластиковую микропробирку, содержащую не более 0,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, аккуратно обрезают (обламывают) стержень и закрывают пробирку.

5.17. Мокроту отбирают при подозрении на ингаляционное заражение в количестве не менее 1 мл в одноразовые стерильные контейнеры, флаконы с широким горлом и завинчивающимися крышками.

5.18. При подозрении на алиментарное заражение испражнения в количестве около 1 г одноразовой лопаткой переносят в стерильный контейнер, флакон с завинчивающейся крышкой.

5.19. Рвотные массы отбирают в количестве не менее 1 мл в стерильные контейнеры, флаконы с завинчивающимися крышками.

5.20. При подозрении на сибиреязвенный менингит спинномозговую жидкость отбирают после пункции поясничной, субокципитальной области или мозговых желудочков в количестве не менее 1 мл и переносят в стерильную одноразовую пластиковую микропробирку.

Также при необходимости отбирают промывные воды бронхов, желудка, испражнения, экссудаты в количестве не менее 1 мл.

5.21. При исследовании аутопсийного материала отбирают кровь (не менее 1 мл), кусочки печени и селезенки (25 – 50 г), лимфоузлов (10 – 20 г) и помещают в одноразовые стерильные контейнеры, флаконы и пробирки.

Отбор материала от животных

5.22. При подозрении на сибирскую язву трупы животных не вскрывают. В случае падежа животного в лабораторию направляют ухо, толстые нефиксированные мазки крови или саму кровь, полученную из надреза периферических сосудов уха. Ухо отрезают с той стороны, на которой лежит труп. Предварительно ухо туго перевязывают шпагатом у основания в двух местах и отрезают между лигатурами. Место отреза уха на трупе прижигают раскаленным металлическим предметом.

При наличии у павшего животного кровянисто-пенистых истечений из носовой полости их собирают в стерильные пробирки.

В случае наличия у трупа животного признаков гнилостного разложения дополнительно отбирают трубчатую кость.

5.23. Если подозрение на сибирскую язву возникло при вскрытии трупа животного или в ходе вынужденного убоя, все манипуляции по вскрытию прекращают и на исследование направляют кровь, кусочки органов (селезенки, печени, лимфатических узлов, в которых имеются характерные патологоанатомические изменения), костный мозг (из грудины или канала бедренной кости), фрагменты отечной ткани.

Материал от трупа необходимо брать и исследовать как можно раньше после смерти, так как размножение посторонней микрофлоры затрудняет выделение культуры возбудителя сибирской язвы. От трупов свиней в обязательном порядке отбирают заглочные, подчелюстные, брыжеечные лимфатические узлы, участки

отечной соединительной ткани. Трупы мелких животных направляют в лабораторию целиком.

5.24. Отбор материала от больных и подозрительных на заболевание животных производится до начала специфического лечения. Отбирают кровь в количестве до 20 мл в пробирку с К2 ЭДТА из яремной вены или из вены уха, у свиней – из вены хвоста. В отдельных случаях у животных берут на исследования пробы фекалий.

5.25. Отбор проб фекалий животных проводят с поверхности почвы, загрязненной экскрементами животных, по возможности, не захватывая вместе с ними частицы почвы. Образцы фекалий отбирают при помощи совка, шпателя в контейнер для сбора кала или в широкогорлые стеклянные (пластиковые) банки с завинчивающимися крышками.

Отбор проб материала из сырья и продукции животного происхождения

5.26. При исследовании полутуш или четвертин туш отбирают пробу мышечной ткани (не менее, чем в 5 точках), лимфатические узлы и трубчатую кость. Из мяса отбирают участки с лимфоидной тканью или кровоизлияниями массой не менее 30 г.

5.27. Отбор проб мясных продуктов осуществляется в соответствии с документами по стандартизации в зависимости от вида продукции.

5.28. Для исследования шерсть отбирают из разных мест, не менее 5 образцов массой около 2 г каждый; предпочтительно отбирать пучки загрязненной шерсти. При отборе проб шерсти, упакованной в кипы, берут не менее 10 образцов из разных мест каждой кипы, а также скопившуюся внутри обшивки пыль. Образцы от одной кипы объединяют и упаковывают вместе.

5.29. Исследованию на сибирскую язву подлежат шкуры небоенского происхождения лошадей, крупного и мелкого рогатого скота, ослов, лошаков, мулов, яков, буйволов, верблюдов, оленей, а также лосей, диких коз, енотовидных собак и диких пушных зверей. Свиные шкуры небоенского происхождения подлежат исследованию в том случае, если на них имеются инфильтраты. Отбирают кусочки кожи размером 3 × 3 см с периферических незагнивших и незаплесневевших участков шкурки. При наличии на внутренней стороне шкурки кровоподтеков или инфильтратов пробы берут и в этих местах.

При отборе проб каждую шкуру маркируют на мездре порядковым номером и номером серии, отбираемую пробу также маркируют тем же номером кожи и серией посредством бумажных или фанерных прокладок. Пробы нанизывают вместе с номерами на шпагат или проволоку связками по 100 проб. К каждой связке прикрепляют бирку с указанием организации, серии, начального и последнего номеров проб.

5.30. При отборе проб лекарственного сырья (панты) определяют объем выборки упаковочных единиц (далее – УЕ) (например, ящики, мешки) из заготовленной партии (серии) пантов следующим образом: при количестве в партии от 1 до 5 УЕ материал отбирают из каждой УЕ, при количестве в партии от 6 до 50 УЕ образцы отбирают из 5 УЕ, при наличии в серии свыше 50 УЕ осуществляют отбор одной УЕ от каждых 10 УЕ партии (серии).

Для отбора пантов, необходимых для проведения исследований на наличие возбудителя сибирской язвы, из каждой выбранной УЕ отбирают три точечные пробы: сверху, снизу и из середины. Масса средней пробы пантов из транспортной единицы составляет не менее 300 г. Среднюю пробу пантов упаковывают во влагонепроницаемую тару, наносят маркировку.

5.31. К эндокринному сырью относят гипофиз, эпифиз, щитовидную и парашитовидную железы, надпочечники, поджелудочную железу, яичники и семенники, зобную железу, желтое тело, плаценту животных. Ферментное сырье включает поджелудочную железу, слизистую оболочку сычугов крупного рогатого скота и свиных желудков, сычуги телят и ягнят; специальное сырье – кровь, желчь, печень, спинной мозг, глаза, эмбрионы животных.

5.32. Отбор проб эндокринного, ферментного и специального сырья для микробиологического анализа на наличие возбудителя сибирской язвы проводят из замороженного, лиофильно высушенного или консервированного поваренной солью сырья. От сырья, подвергнутого консервации химическим методом (спирт, ацетон, формалин), отбор проб не производят.

Определение объема выборки проводят следующим образом: при количестве в партии (серии) от 2 до 15 УЕ отбирают 2 УЕ, от 16 до 25 – 3 УЕ, от 26 до 90 – 5 УЕ, от 91 до 150 – 8 УЕ, от 151 до 500 – 13 УЕ, от 500 до 1200 – 20 УЕ, свыше 1200 – 32 УЕ.

Из каждой УЕ замороженного, лиофильно высушенного или консервированного поваренной солью сырья, попавшей в выборку, отбирают три точечные пробы для проведения исследований на наличие возбудителя сибирской язвы: по краям и из середины УЕ. Средняя проба сырья из УЕ составляет не менее 150 г.

Из проб жидкого специального сырья (кровь, желчь) среднюю пробу отбирают пробоотборником после тщательного перемешивания, погружаемого на всю глубину УЕ по вертикальной оси. Объем средней пробы – не менее 150 г. Средние пробы сырья упаковывают во влагонепроницаемую тару, наносят маркировку.

Отбор проб из объектов окружающей среды

5.33. Пробы почвы отбирают по эпидемическим показаниям с мест вероятной контаминации возбудителем сибирской язвы (мест вынужденного убоя, падежа скота, стоянок и водопоя больных животных), а также с территории почвенных очагов сибирской язвы (СЯЗ, «моровых полей») и прилегающих к ним территорий СЗЗ для проведения комплексной оценки их эпидемиологической опасности.

Для отбора проб с территории почвенных очагов сибирской язвы и прилегающей территории с целью оценки риска СЯЗ здоровью населения привлекаются организации, имеющие лицензию на проведение работ с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)⁴⁸.

При составлении программы отбора проб для проведения комплексной оценки эпидемиологической опасности почвенных очагов (СЯЗ, «моровое поле»)

⁴⁸ Постановление Правительства Российской Федерации от 25.01.2022 № 46.

количество отбираемых проб почвы с территории почвенного очага и прилегающей территории СЗЗ определяется степенью его опасности в зависимости от эпизоотолого-эпидемиологической ситуации и характера почвенного очага; контрольные точки отбора проб на территории почвенного очага и прилегающей территории определяются исходя, например, из эпидемиологических особенностей, особенностей ландшафта, гидрогеологической характеристики местности, типа планируемой хозяйственной деятельности⁴⁹.

При отборе проб с больших участков обследуемую площадь разбивают на квадратные участки со стороной не более 4 м. В каждом квадрате намечают 4 точки по краям и 1 посередине (отбор «конвертом») или 9 точек (отбор «зигзагом») согласно рисунку 1. На большой площади при неизвестном точном местоположении почвенного очага применяется секторальное деление: в каждом секторе намечают центр и пробы отбирают «конвертом». При отборе проб из единичного СЯЗ типа биотермической («чешской») ямы осуществляют точечный отбор в центре. Места отбора проб отмечают на карте-схеме исследуемой территории с указанием географических координат. При невозможности осуществить отбор проб вышеописанными методами (например, наличие высокого вала, корней деревьев) схему отбора составляют с учетом реальных условий.

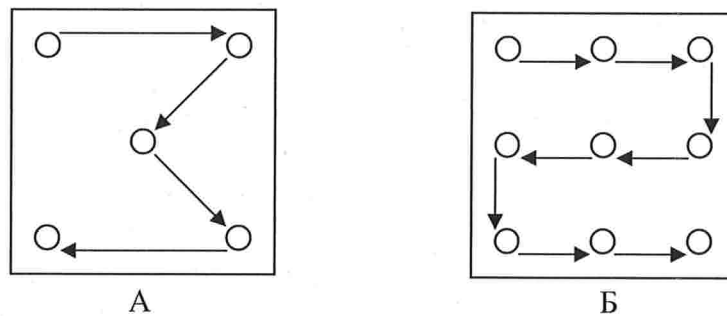


Рисунок 1. Схема отбора проб почвы «конвертом» (А), «зигзагом» (Б)

Отбор проб осуществляют с использованием почвенных буров (ручной, механический, бензиновый), бурильной установки, гидравлических навесных ямобуров, бурильно-крановых машин, универсальных буровых машин на автомобильном шасси или тракторов. Пробы почвы на территории поверхностных почвенных очагов (например, мест вынужденного убоя, падежа скота) отбирают лопатой.

Пробы почвы с мест вынужденного убоя, падежа скота, стоянок и водопоя больных животных берут на глубине до 15 см.

Перед отбором образцов почвы на территории СЯЗ, «морových полей» производят расчистку лопатой точек забора проб от мусора, листьев и травы. У места отбора проб почвы расстилают полиэтиленовую пленку размером не менее 100 × 100 см, над которой отобранную почву сыпают в упаковочную тару.

⁴⁹ МР 3.1.0232-21 «Определение эпидемиологической опасности почвенных очагов сибирской язвы», утвержденные руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 01.03.2021 (далее – МР 3.1.0232-21).

Из каждой точки отбора на территории СЯЗ отбирают по 4 пробы: с глубины 0,5 м, 1 м, 1,5 м и 2 м не менее 200 г в пробе, которые смешивают и формируют 1 пробу (не менее 200 г) для лаборатории. Особое внимание обращают на костные и другие животные останки, которые также отбирают для исследования, пробы упаковывают в том же порядке.

Из каждой точки на территориях, прилегающих к СЯЗ, а также на территории иного почвенного очага («морového поля») отбирают по 2 пробы (по 200 г) с глубины 0,15 м и 0,5 м, которые при смешивании составляют 1 пробу для последующего лабораторного исследования.

На прилегающей к СЯЗ территории пробы почвы отбирают с одинаковым шагом в 4–5 м во всех доступных для забора направлениях в зависимости от ландшафтных и иных условий местности; далее пробы отбирают по направлению течения грунтовых вод в сторону понижения рельефа местности, по границе жилой застройки, ферм, вблизи водоисточников и других объектов инфраструктуры, находящихся в радиусе 1000 м от СЯЗ.

Каждую пробу весом около 200 г помещают при помощи почвенного ножа, совка или шпателя в матерчатые мешочки, пакеты из крафт-бумаги, пакеты «Грунт» или в широкогорлые емкости. Для упаковки проб почвы полиэтиленовые пакеты не используются, так как в этих условиях происходит бурное развитие актиномицетов, губительно действующих на сибирезвенный микроб.

После отбора проб остатки почвы, находящиеся на полиэтиленовой пленке или пергаментной бумаге, ссыпают в образовавшиеся шурфы. Вынутую из глубины и не использованную для проб почву с целью обеззараживания смешивают с дезинфектантом, содержащим 25 % активного хлора, в соотношении 1 часть дезинфектанта на 3 части почвы, слегка увлажняют и сбрасывают в шурф. Место отбора проб посыпают сухим порошком хлорсодержащего средства или поливают раствором, содержащим 5 % активного хлора; бур, шнек ямобура, лопату, совок – обжигают огнем газовой горелки или паяльной лампы после каждого использования.

5.34. Кости и костные фрагменты животных отбирают с поверхности почвы в местах, например, вынужденного убоя скота, падежа, на территории полигонов твердых бытовых и неуполитизированных биологических отходов, а также при отборе проб почвы на территориях почвенных очагов сибирской язвы (учтенных и несанкционированных СЯЗ, «морových полей») и прилегающих территориях в пределах установленной или предполагаемой СЗЗ СЯЗ⁵⁰.

Кости и костные фрагменты, останки животных отбирают в пергаментную бумагу, пакеты для транспортировки биологически опасных образцов (типа «Вихрь-Карман-Лейбл») или промаркированные тканевые мешки, плотно завязывают и помещают в металлический бикс для транспортировки.

5.35. Пробы воды отбирают как по эпидемическим показаниям, так и при проведении комплексной оценки эпидемиологической опасности почвенных очагов.

Воду отбирают в стеклянную или одноразовую посуду из полимерных материалов, с плотно закрывающимися стерильными непромокаемыми пробками

⁵⁰ МР 3.1.0232-21.

(например, силиконовые, резиновые), завинчивающимися крышками. Стерильные емкости открывают непосредственно перед отбором образца, не касаясь горлышка емкости и внутренней стороны крышки руками. Воду из поверхностных слоев отбирают при помощи специальных черпаков. Емкость заполняют на 2/3 объема для того, чтобы между пробкой и поверхностью воды оставалось воздушное пространство.

Пробы воды из естественных и искусственных водоемов берут с различной глубины: 10 – 15 см от поверхности и 30 – 50 см от дна при помощи батометра или специально приспособленной бутылки. Отбор проб придонных слоев воды проводят с использованием батометров, представляющих собой металлический каркас с массивным свинцовым дном-грузилом. Используют батометры, изготовленные из материала, выдерживающего суховоздушную или паровую стерилизацию. В металлический каркас вставляют емкость, батометр погружают на глубину и открывают, потягивая за веревку, привязанную к пробке. После заполнения батометр извлекают и закрывают емкость стерильной пробкой. При отборе одним батометром нескольких проб его каждый раз обрабатывают фламбированием. Пробу воды зимой отбирают бутылкой, привязанной к шесту.

Объем каждой пробы не менее 0,5 л, общий объем не менее 1 л.

При оценке эпидемиологической опасности почвенных очагов пробы воды отбирают из естественных и искусственных водоисточников, находящихся непосредственно на территории почвенного очага или в радиусе 1000 м от него.

При отборе проб проточной воды из открытых водоемов могут применяться сорбенты для селективного концентрирования спор возбудителя сибирской язвы или предназначенные для неселективного концентрирования микроорганизмов, используемые в соответствии с инструкцией по эксплуатации.

5.36. Пробы придонного осадка, ила водоемов отбирают как по эпидемическим показаниям, так и при проведении комплексной оценки эпидемиологической опасности почвенных очагов. Образцы отбирают из поверхностных слоев у береговой кромки водоема, помещают в широкогорлые контейнеры с завинчивающимися крышками. Масса каждой пробы – не менее 100 г.

5.37. Пробы атмосферного воздуха отбирают как по эпидемическим показаниям, так и при проведении комплексной оценки эпидемиологической опасности почвенных очагов для установления СЗЗ СЯЗ. Пробы аэрозолей отбирают аспирационным методом с помощью пробоотборников воздуха, снаряженных сорбирующей жидкостью или фильтрами: фильтрующей перхлорвиниловой тканью Петрянова (ФПП-15), аналитическими аэрозольными фильтрами и др. Объем исследуемого воздуха должен составлять не менее 3 – 5 м³.

После прокачки воздуха фильтрующую установку отключают, осторожно, не встряхивая, снимают фильтродержатель с фильтром или жидкостной пробоотборник, помещают его в футляр для переноски и доставляют в лабораторию.

5.38. Пробы растительности отбирают путем срезания листьев, травы, мха и пр. Образцы растений помещают в одноразовые пакеты типа «Вихрь».

5.39. Концентрированные корма (зерно, отруби, комбикорм) отбирают в зависимости от условий хранения. При наличии незатаренных кормов первичные пробы отбирают из расчета 1 проба не менее 400 г на 4 м² поверхности, но не менее 5 проб от каждого закрома, партии. Первичные пробы берут как из поверхностных, так и из глубоких слоев корма равномерно по всей площади. При наличии затаренных кормов отбор проводят от каждой упаковочной единицы. Отбор проб проводят сухим пробным щупом. После взятия проб от каждого объекта (партии) щуп очищают и обжигают огнем паяльной лампы.

Пробы грубых кормов (сено, солома) берут из разных мест скирды при помощи ножниц и пинцета из расчета 1 проба (40 г) на 4 м² площади скирды. Зеленую массу отбирают, как грубые корма. Корнеплоды, в зависимости от величины, отбирают из расчета 1 – 3 штуки на 4 м² площади бурта, отсека. С отобранных корнеплодов скальпелем в местах, где имеются остатки земли, срезают поверхностный слой, который используют для исследования.

В лабораторию направляют среднюю пробу, которую составляют из хорошо перемешанных, например, первичных проб данной партии, емкости. Масса средней пробы – не менее 500 г.

5.40. В эпизоотических очагах осуществляют определение относительной численности и сбор слепней, moskitov, мух-жигалок, клещей и блох в соответствии с порядком работ с кровососущими членистоногими в природных очагах инфекционных болезней⁵¹. Объем энтомологических работ определяется при участии заведующего зоолого-энтомологической группой (зоолога) с учетом экологических особенностей переносчика и фенологического сезона года.

5.41. Смывы с ООС производят с мест наиболее вероятного обсеменения возбудителем сибирской язвы одноразовым зонд-тампоном или стерильным тампоном, смоченным стерильной водой или 0,9 % раствором натрия хлорида. Площадь смыва одним зонд-тампоном составляет около 100 см² (10 × 10 см). Далее зонд-тампон помещают в одноразовую пластиковую микропробирку, содержащую не более 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, аккуратно обрезают (обламывают) стержень и закрывают пробирку.

VI. Подготовка проб к исследованию

6.1. Плотные, сухие, сыпучие пробы предварительно переводят в жидкое состояние. Пробы в жидком состоянии используют для исследования без добавления дополнительной жидкости. В случае, когда объем нативной жидкой пробы недостаточен для исследований, объем пробы доводят до необходимого (не более 5 мл) добавлением стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида. При поступлении жидких проб объемом более 50 мл проводят концентрирование фильтрованием или центрифугированием.

⁵¹ МР 3.1.0322-23 «Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих в природных очагах инфекционных болезней», утвержденные руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 13.04.2023 (далее – МР 3.1.0322-23).

6.2. Кусочки проб мяса, органов и тканей помещают в ступку, измельчают ножницами или пестиком, измельчителями, обеспечивающими герметичность (лопаточным блендером, гомогенизатором перистальтическим), затем заливают стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида в соотношении 1:10, суспензию через марлевый тампон набирают в шприц или пипетку и переносят в пробирку.

6.3. Кусочки проб из шкур массой в 1 г помещают в фарфоровую ступку и заливают стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида из расчета 1:10. Кусочки измельчают ножницами и оставляют при комнатной температуре на 2–3 ч для размягчения материала. После этого пробы хорошо растирают пестиком в той же жидкости до получения волокнистой мезги, которую удаляют, предварительно отжав ее пестиком на внутренней боковой поверхности ступки.

6.4. От каждой пробы шерсти отбирают наиболее загрязненные части, измельчают ножницами, вместе с пылью помещают в колбу и заливают стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида из расчета 1:10. Колбу закрывают, аккуратно перемешивают содержимое круговыми движениями в течение 5–10 мин. Для освобождения от грубых частиц взвесь можно профильтровать через 2–3 слоя марли.

6.5. Пробы костей и костных фрагментов животных мелких и средних размеров дробят в лабораторном гомогенизаторе. Костные сколы и измельченные частицы массой 10–30 г переносят шпателем в пробирки (флаконы), заливают 0,9 % раствором хлорида натрия или водой в соотношении 1:10, закрывают и тщательно встряхивают в течение 10 мин на лабораторном шуттеле (шейкере). Затем дают отстояться, переносят надосадочную жидкость в отдельную пробирку.

6.6. Пробы кормов, растительности (например, травы, листьев, мха), поверхностного слоя корнеплодов, подстилки предварительно измельчают ножницами, помещают в лабораторную посуду, заливают 0,9 % раствором хлорида натрия в соотношении 1:10, тщательно перемешивают в течение 5–10 мин, дают отстояться 3–5 мин, затем переносят надосадочную жидкость в отдельную пробирку.

6.7. Кровососущих членистоногих группируют, объединяя в одну пробу насекомых одного вида (рода), а также стадии развития, добытых из одного места, помещают в сухие пробирки. Слепней, мух-жигалок объединяют до 20–25, мошек – до 250 особей в пуле. Эктопаразитов, собранных с трупов животных, имеющих патологические изменения, характерные для сибирской язвы, исследуют индивидуально. Перед сортировкой кровососущих двукрылых насекомых усыпляют парами эфира для ограничения подвижности. У слепней предварительно отстригают конечности и крылья⁵². После сортировки насекомых помещают в фарфоровую ступку, заливают стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида из расчета 1:10 и гомогенизируют пестиком, дают отстояться 3–5 мин, затем переносят надосадочную жидкость в отдельную пробирку.

6.8. Пробы почвы освобождают от корней, камешков, тщательно перемешивают.

При исследовании проб, которые могут содержать споры *B. anthracis*, в качестве диспергирующей жидкости используют 0,9 % раствор натрия хлорида, 0,5 % раствор пирогенфосфата натрия или дистиллированную воду с 0,01 % Твином-80.

⁵² МР 3.1.0322-23.

В случаях, когда исследуемые образцы могут содержать вегетативные формы *B. anthracis* (почвы, богатые гумусом, исследование в весенний и осенний периоды, фекалии животных), в качестве диспергирующей жидкости используют только 0,9 % раствор натрия хлорида, так как присутствие неионных и ионных поверхностно-активных веществ может приводить к инаktivации вегетативных клеток возбудителя и получению ложноотрицательных результатов исследований.

От каждой пробы берут 100 г почвы, помещают в колбу, заливают диспергирующей жидкостью из расчета получения 15–20 мл суспензии. Колбу закрывают, аккуратно перемешивают содержимое круговыми движениями в течение 5–10 мин, дают отстояться 3–5 мин, надосадочную жидкость переносят в пробирку.

6.9. Для повышения эффективности выявления спор *B. anthracis* целесообразно проводить двукратную обработку образцов почвы диспергирующей жидкостью с последующим центрифугированием. Для этого на первом этапе проводят подготовку проб почвы согласно п. 6.8. Далее к образцу почвы вновь добавляют диспергирующую жидкость в половинном объеме и повторяют процедуру элюции. Надосадочные жидкости после первой и второй элюции объединяют в одной центрифужной пробирке и центрифугированием при 1000 об/мин в течение 15 мин удаляют механические примеси. Надосадов переносят в центрифужную пробирку и микробную взвесь концентрируют центрифугированием при 6000 об/мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость декантируют, а осадок ресуспендируют в стерильном 0,9 % растворе натрия хлорида (не более 5 мл) и используют для исследования. Процедуру центрифугирования проводят в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями к обеспечению безопасности при работе с микроорганизмами I–II групп патогенности⁵³.

6.10. На эффективность выделения спор из почвенных образцов существенное влияние оказывают показатели свободной влаги в почве и значение ее рН. Чем суше почва и ниже (рН < 6,0), тем прочнее комплекс «частица почвы – спора» и ниже эффективность изоляции спор. Для повышения эффективности выделения спор из сухих и кислых почв проводят ряд подготовительных мероприятий перед подготовкой проб почв к исследованию.

На первом этапе визуально и тактильно оценивают влажность почвенного образца. Если влажность почвы оценивается как низкая, то проводят предварительное насыщение почвенного образца свободной влагой для ослабления связи «частица почвы – спора». С этой целью к пробе почвы добавляют диспергирующую жидкость в количестве, необходимом для получения в последующем 15–20 мл надосадочной жидкости (принимая во внимание влажность почвы) и оставляют при комнатной температуре на 3 ч, периодически перемешивая почвенную суспензию круговыми движениями. При помощи индикаторной полоски определяют рН почвенной суспензии и в случае необходимости доводят ее до 6,8–7,2 путем добавления 1 N раствора гидроксида натрия.

⁵³ Пункт 334 СанПиН 3.3686-21.

6.11. Различные порошкообразные вещества, в том числе пищевые продукты и корма, обрабатывают аналогично почве (см. п. 6.8), используя в дальнейшем надосадочную жидкость или раствор в случае растворения вещества.

6.12. Воду с илистыми частицами фильтруют через 3 слоя марли. Чистую воду исследуют без предварительной подготовки. С целью концентрирования микробов пробы воды можно профильтровать через мембранные фильтры для микробиологических исследований или осадить центрифугированием при 6000 об/мин в течение 15 мин. Осадок с каждого фильтра соскабливают скальпелем (или фильтры измельчают стерильными ножницами), затем заливают 1 – 2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Осадок после центрифугирования также ресуспендируют в 1 – 2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Полученную взвесь используют для исследования. Отфильтрованную воду обеззараживают добавлением сухой хлорной извести из расчета 200 г на 1 л.

6.13. Пробоподготовку придонного осадка, ила осуществляют аналогично подготовке проб почвы (см. п. 6.8). Для исследования используют надосадочную жидкость.

6.14. Аэрозольные фильтры, сорбирующую жидкость из фильтрующих установок, с использованием которых осуществлялся отбор проб воздуха, подготавливают к исследованиям согласно инструкции по эксплуатации прибора.

6.15. С целью повышения эффективности детекции возбудителя сибирской язвы в образцах почвы, проточной воды открытых водоемов и других объектов окружающей среды при пробоподготовке могут использоваться магноиммуносорбенты (далее – МИС) для селективного концентрирования спор *B. anthracis*. Пробоподготовку проводят в соответствии с инструкцией производителя по применению МИС.

Принцип пробоподготовки с использованием МИС (на примере пробоподготовки образцов почвы). От каждой пробы берут 100 г почвы, помещают в колбу, заливают дистиллированной водой из расчета получения 15 – 20 мл суспензии. Колбу закрывают, аккуратно перемешивают содержимое круговыми движениями в течение 5 – 10 мин, дают отстояться 3 – 5 мин. Надосадочную жидкость в количестве 15 – 20 мл переносят во флаконы (типа фалькон), далее в каждый образец добавляют споровые сибиреязвенные МИС в объеме, указанном в инструкции, инкубируют при температуре плюс $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 20 – 30 мин. После этого каждый образец с МИС отмывают дистиллированной водой 5 – 7 раз с помощью дозатора, удерживая МИС на дне флакона постоянным магнитом. После отмывки МИС готовы для дальнейших исследований.

Для бактериологических исследований каждый образец отмытых МИС высевает на чашки с селективной средой. Исследования проб проводят в соответствии с п.п. 7.15 – 7.19. Для исследования образцов методом ПЦР отмытые МИС переносят в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 – 2,0 мл с 0,9 мл бульона Хоттингера (рН 7,2) и проводят пробоподготовку в соответствии с п. 6.16 с последующим проведением ПЦР-исследования (см. п. 7.7).

Предварительная обработка проб для исследования методом ПЦР

6.16. Обеззараживание материала проводят согласно методическим указаниям по организации работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I – IV групп патогенности⁵⁴. Предварительно подготовленный материал в количестве 0,1 мл или одну бактериологическую петлю 18-часовой агаровой культуры подозрительных на возбудитель сибирской язвы колоний засевают в пробирки с 0,9 мл бульона Хоттингера (рН 7,2 – 7,4) и инкубируют в термошейкере (60 – 80 об/мин) при температуре плюс $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 2,5 ч. Далее в пробирки добавляют пенициллин (или другой антибиотик из группы пенициллинов) до конечной концентрации 1000 ЕД/мл и инкубируют 15 мин при температуре плюс $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$. Затем прогревают 10 мин при температуре плюс $(100 \pm 1)^\circ\text{C}$ (в твердотельном термостате или на водяной бане).

После проведенных манипуляций 100 мкл обработанного образца переносят в пробирки объемом 1,5 – 2,0 мл и добавляют лизирующий раствор в объеме, указанном в инструкции по применению к набору реагентов для выделения дезоксирибонуклеиновой кислоты (далее – ДНК), и инкубируют 15 мин при температуре плюс 65°C . После выполнения данных процедур материал считается обеззараженным.

6.17. При необходимости после этапа прогрева при температуре плюс $(100 \pm 1)^\circ\text{C}$ пробы могут быть сконцентрированы путем центрифугирования при 12000 об/мин в течение 15 мин с последующим ресуспендированием осадка в 100 мкл 0,9 % раствора хлорида натрия.

VII. Лабораторные исследования при сибирской язве

7.1. Целью исследования является лабораторное подтверждение клинического, эпидемиологического, эпизоотологического и патологоанатомического диагноза сибирской язвы, а также установление источника возбудителя инфекции или фактора его передачи, выявление возбудителя на территориях почвенных очагов сибирской язвы – СЯЗ, на прилегающих к СЯЗ территориях, входящих в СЗЗ, «морových полей».

7.2. Подтверждение основывается на результатах исследования материала и включает два этапа:

1) обнаружение возбудителя сибирской язвы, его компонентов (ДНК, антигенов, белков), маркеров (антител) в биологическом материале от людей, патологическом материале от животных, сырье и продукции животноводства, в ООС, эпизоотолого-эпидемиологически связанных с заболеванием людей и (или) животных;

2) выделение и идентификация культуры возбудителя с последующим изучением ее свойств⁵⁵.

7.3. Лабораторные исследования на сибирскую язву проводят с использованием бактериоскопических, бактериологических, биологических,

⁵⁴ МУ 1.3.2569-09.

⁵⁵ Глава XI СанПиН 3.3686-21.

молекулярно-биологических, иммунологических методов⁵⁶. Они включают световую микроскопию, люминесцентную микроскопию (МФА, непрямой метод флуоресцирующих антител (далее – нМФА), высевы на питательные среды, постановку биологической пробы, ПЦР, реакцию непрямой гемагглютинации (далее – РНГА), ИФА, реакцию Асколи, аллергодиагностику *in vitro*, иммунохроматографический тест, дополнительные исследования с применением иммуночипов (выявление антител к спектру антигенов сибиреязвенного микроба и антигенов возбудителя сибирской язвы с использованием панелей специфических антигенов и специфических моноклональных (поликлональных) антител к *B. anthracis*), постановку основных и дополнительных тестов идентификации выделенных культур, использование методов молекулярного анализа: анализ «канонических» единичных нуклеотидных полиморфизмов (далее – canSNP-типирование), анализ варибельного числа tandemных повторов (далее – VNTR-анализ, многолокусный VNTR-анализ), мультилокусное сиквенс-типирование генов вирулентности (далее – MVLST), анализ единичных нуклеотидных повторов (далее – SNR-типирование), секвенирование нового поколения, массовое параллельное (полногеномное) секвенирование (англ. next generation sequencing, далее – NGS), времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией (ионизацией) (далее – MALDI-TOF MS).

7.4. При исследовании материала от людей и животных готовят мазки из нативных проб для световой микроскопии (с окрашиванием по Граму, Ребигеру) и МФА (с окрашиванием люминесцирующими иммуноглобулинами), засевают на плотные и жидкие питательные среды, заражают лабораторных животных, проводят ПЦР-анализ, исследования с использованием иммунологических методов.

Пробы сырья животного происхождения, из ООС исследуют с использованием бактериологического, биологического методов, ПЦР-анализа. Микроскопию мазков из такого материала проводят при вероятном содержании в пробах значительного количества спор ввиду низкой чувствительности бактериоскопических методов исследования, составляющей от 1×10^5 – 1×10^6 микробных клеток в миллилитре (далее – м.к./мл). Проведение бактериоскопических исследований образцов почвы с территории старых почвенных очагов сибирской язвы (СЯЗ, «морových полей») нецелесообразно в связи с низкой концентрацией в них сибиреязвенного микроба, а также наличием в почве множества видов бактерий рода *Bacillus*, обладающих схожей с возбудителем сибирской язвы морфологией и антигенной структурой.

При исследовании материала, в котором предполагается наличие возбудителя сибирской язвы в споровой форме и присутствие значительного количества прочих микроорганизмов (например, образцы почвы, шкур, шерсти, кормов), пробы, подготовленные по описанным выше методикам (см. глава VI), перед проведением исследований прогревают на водяной бане или в твердотельном термостате при температуре плюс 80 °С в течение 20 мин для избавления от посторонней микрофлоры. Пробы биологического материала, патологического материала от животных, прочих видов материала, в котором предполагается

⁵⁶ Пункты 1031 – 1033 СанПиН 3.3686-21.

наличие возбудителя сибирской язвы в вегетативной форме, перед исследованием не прогревают.

Патологоанатомический материал от животных, кожевенно-меховое, пантовое сырье также исследуют путем постановки реакции преципитации по Асколи.

Загнивший биологический материал исследуют с помощью ПЦР и реакции преципитации.

7.5. Окончательная идентификация и углубленное изучение штаммов возбудителя сибирской язвы, выделенных в лабораториях ООИ ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъекте Российской Федерации, Центрах индикации, проводится в Референс-центре по мониторингу за возбудителем сибирской язвы, Центрах верификации (см. п.п. 4.17, 4.20, 4.22, 4.24)⁵⁷.

Индикация ДНК *B. anthracis* в исследуемом материале методом ПЦР

7.6. При исследовании материала методом ПЦР используется оборудование и расходные материалы в соответствии с приложением 5 к настоящему МУ.

7.7. Выявление ДНК возбудителя сибирской язвы в образцах проводят с использованием ПЦР тест-систем с учетом результатов в режиме «реального времени» или методом электрофореза в агарозном геле. Для получения валидных результатов предпочтение отдается мультиплексным тест-системам, позволяющим одновременно выявлять несколько мишеней генома *B. anthracis*. При исследовании нативных проб с низкой обсемененностью возбудителем сибирской язвы с использованием метода ПЦР с учетом результатов в режиме «реального времени» в случае получения отрицательных результатов амплификации генов, расположенных на плазмиде рХО1, проводится подтверждение результатов с помощью тест-систем, основанных на применении технологий с более высокой чувствительностью, например, «гнездовая» ПЦР, что связано с невысокой копийностью плазмиды рХО1 у штаммов *B. anthracis*.

7.8. Предварительная обработка проб проводится в соответствии с п. 6.15. Работу проводят в соответствии с инструкциями по применению наборов для экстракции ДНК и диагностических тест-систем.

7.9. В качестве дополнительного метода выявления ДНК возбудителя сибирской язвы с применением ПЦР могут быть использованы ДНК-чипы. Предпочтительно использовать ДНК-чипы, где реализована возможность анализа двух и более фрагментов генов *B. anthracis*. Исследования проводят в соответствии с инструкцией по использованию набора реагентов.

Бактериоскопический метод

7.10. При исследовании материала бактериоскопическим методом (световая и люминесцентная микроскопия) используется оборудование и расходные материалы в соответствии с приложением 5 к настоящему МУ.

⁵⁷ Приказ Роспотребнадзора от 01.12.2017 № 1116.

7.11. Мазки готовят на предметных стеклах со шлифованным краем для маркировки стекла. На шлифованной поверхности каждого стекла проставляют графитным карандашом номер пробы. Предметные стекла должны быть заранее тщательно вымыты и обезжирены.

7.12. Для световой микроскопии из поступившего биологического материала (от людей и животных) готовят несколько мазков, которые подсушивают на воздухе, фиксируют в 95 – 96 % этиловом спирте с добавлением 3 % перекиси водорода в течение 30 мин (приложение 6 к настоящим МУ), после этого окрашивают по Граму и на наличие капсулы одним из методов (по Ребигеру, Михину, Романовскому-Гимзе, Ольту, Клетту, Гинсу, Леффлеру).

В окрашенных мазках из патологического материала сибиреязвенный микроб представляет собой грамположительные палочки, располагающиеся короткими цепочками или попарно. Концы палочек, обращенные друг к другу, резко обрублены, свободные концы могут быть закруглены. В отдельных случаях (чаще в мазках из биологического материала от человека или свиней) форма возбудителя сибирской язвы может быть нехарактерной (короткие, толстые или изогнутые, иногда зернистые палочки со вздутием посередине или на конце, возможно наличие «теней» микробов). В мазках из культуры с жидкой и плотной питательных сред бациллы располагаются в виде коротких и длинных цепочек, соответственно.

Наиболее эффективным методом окраски для обнаружения капсулы является окраска по Ребигеру (приложение 6 к настоящим МУ). На всю поверхность фиксированного мазка пипеткой наносят раствор по Ребигеру и выдерживают 30 – 60 с, затем промывают водой и высушивают.

В мазках из свежего патологического материала капсула вокруг микроба окрашивается в розовый или красно-фиолетовый цвет, тело микробной клетки – в темно-фиолетовый. В мазках из крови и спинномозговой жидкости палочки с капсулой увеличены, края микроба закруглены.

При окраске мазков из несвежего патологического материала микробы могут быть также несколько увеличены, концы закруглены, морфологическая стройность бацилл нарушена, они как бы «изъедены», иногда остаются «тени», а от капсулы могут оставаться одни обрывки, которые окрашиваются очень слабо.

7.13. Для обнаружения спор в образцах из окружающей среды после фиксации мазки окрашивают раствором Ребигера или карболовым фуксином по Цилю-Нильсену (приложение 6 к настоящим МУ).

При окрашивании мазков раствором по Ребигеру краситель наносят пипеткой на всю поверхность фиксированного мазка и выдерживают 30 – 60 с, затем промывают водой и высушивают. При окрашивании мазков по Ребигеру периферия спор приобретает темно-фиолетовый цвет.

Для окрашивания карболовым фуксином по Цилю-Нильсену после фиксации мазков на стекло кладут полоску фильтровальной бумаги, на которую наносят карболовый фуксин Циля. Мазок с краской подогревают на пламени спиртовки до появления паров (но не до кипения), краску оставляют на препарате без подогревания еще на 2 – 3 мин. Бумагу удаляют пинцетом, краску сливают, препарат промывают водой, затем обесцвечивают 5 % серной кислотой до желтоватого оттенка (в течение 3 – 5 с). Тщательно отмывают препарат водой.

Докрашивают мазок метиленовым синим Леффлера 2 – 3 мин, смывают водой и просушивают. Препарат просматривают под микроскопом с иммерсионной системой. Споры, в зависимости от стадии формирования и степени жизнеспособности, могут окрашиваться по Цилю-Нильсену следующим образом:

- 1) розовые с более интенсивной окраской по периферии – жизнеспособные споры;
- 2) равномерно окрашенные в красный цвет – нежизнеспособные мертвые споры;
- 3) синие и фиолетовые – прорастающие споры.

В мазках палочки *B. anthracis* окрашиваются в синий цвет.

7.14. Для люминесцентной микроскопии делают мазки из свежего нативного биологического материала, патологоанатомического материала от животных с подозрением на высокую степень контаминации возбудителем сибирской язвы, а также мазки-отпечатки из экссудата брюшной полости и органов биопробных животных, мазки-отпечатки из отечной жидкости и внутренних органов людей и животных, мазки из колоний, выросших на чашках с питательными средами. Такой материал окрашивают диагностическими флуоресцирующими адсорбированными вегетативными сибиреязвенными иммуноглобулинами. Мазки из смывов, суспензий из различных ООС, сырья животного происхождения, с подозрением на наличие высокой концентрации возбудителя сибирской язвы, окрашивают диагностическими флуоресцирующими адсорбированными споровыми сибиреязвенными иммуноглобулинами.

Приготовленные мазки высушивают на воздухе при комнатной температуре. Подсушенные мазки фиксируют в смеси 95 – 96 % этилового спирта с 3 % перекиси водорода в течение 30 мин. После окончания времени экспозиции стекла с мазками рекомендуется промыть под струей воды в течение 3 – 5 мин с целью исключения негативного воздействия перекиси водорода на специфическую флуоресценцию.

Окраску подготовленных мазков проводят согласно инструкциям по применению диагностических флуоресцирующих вегетативных и споровых сибиреязвенных иммуноглобулинов.

Мазки с нанесенными на них люминесцирующими иммуноглобулинами помещают во влажную камеру (чашку Петри или эксикатор с увлажненной 0,9 % раствором натрия хлорида (дистиллированной водой) фильтровальной бумагой или комочком ваты), выдерживают для окрашивания при температуре плюс $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 20 мин. После этого их тщательно промывают два раза по 10 мин в 0,9 % растворе натрия хлорида, затем в дистиллированной воде и высушивают на воздухе. Препараты покрывают покровными стеклами или просматривают *ex tempore* без покровных стекол. Мазки микроскопируют в люминесцентном микроскопе с системой подобранных светофильтров и иммерсионным объективом. При этом необходимо пользоваться нефлуоресцирующим иммерсионным маслом. В случае его отсутствия применяют смесь, содержащую 1 часть 0,9 % раствора натрия хлорида и 9 частей химически чистого глицерина. Споры и вегетативные клетки сибиреязвенного микроба, окрашенные флуоресцирующими иммуноглобулинами, дают яркое свечение периферии клеток, имеющих характерную для данного вида морфологию. Такое

свечение называется специфическим, в отличие от неспецифического, характеризующегося равномерным неярким свечением всей поверхности клеток. Для учета результатов используется арбитражная система оценки по интенсивности свечения и количеству специфически светящихся клеток:

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

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

- 2+ или 1+ – слабое свечение периферии клетки, не контрастирующее с ее телом.

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

Чувствительность МФА составляет 5×10^5 м.к./мл исследуемого материала.

Бактериологический метод

7.15. При исследовании материала бактериологическим методом используется оборудование и расходные материалы в соответствии с приложением 5 к настоящим МУ.

7.16. При посеве на питательные среды, подготовленный для исследования материал засевают на чашки Петри с МПА, агаром Хоттингера (рН 7,2) или агар по Лурия-Бертани (далее – LB-агар), селективную питательную среду для выделения возбудителя сибирской язвы, селективную дифференциально-диагностическую среду с 0,01 % натрия фенолфталеинфосфата или 0,05 % динатриевой соли пара-нитрофенилфосфата (приложение 7 к настоящим МУ).

Для посева одной пробы предпочтительно использовать не менее 3 чашек с питательной средой. Поверхность агара перед посевом должна быть совершенно сухой. Посев необходимо производить с помощью шпателя, предварительно нанося на поверхность агара 1 – 2 капли (0,1 мл) исследуемого материала. Если материал значительно загрязнен посторонней микрофлорой (например, почва, корма, смывы с поверхностей), делают посевы методом истощения, распределяя материал шпателем по поверхности агара с переносом на 2 – 3 чашки. При исследовании материала, слабо загрязненного посторонней микрофлорой (кровь, пунктаты из карбункула, органы биопробных животных), посев можно проводить петлей без истощения, используя при этом МПА, агар Хоттингера, кровяной агар и МПБ (бульон Хоттингера), бульон по Лурия-Бертани (далее – LB-бульон).

При посеве крови из периферических ушных сосудов животных или сосудов ворсистой ткани пантов, истечений из носовой полости бактериологической петлей захватывают каплю биоматериала и штрихом засевают на поверхность плотной питательной среды.

Посевы помещают в термостат при температуре плюс $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ на 18 – 24 ч и при отсутствии роста выдерживают при той же температуре 48 ч.

7.17. Оценка характера роста (культурально-морфологических свойств) на питательных средах. Через 18 – 24 ч инкубации плотные питательные среды просматривают визуально и под микроскопом при малом увеличении.

Кроме колоний сибиреязвенного микроба, на средах может наблюдаться рост близкородственных спорообразующих сапрофитов, морфологически трудно отличимых от *B. anthracis*.

Возбудитель сибирской язвы формирует плоские матово-серые шероховатые (R-форма) колонии. Центр их иногда затемнен, периферия бахромчатая с локонообразными отростками. Встречаются колонии с менее выраженной шероховатостью и без отростков, которые также подлежат дальнейшей идентификации. Колонии *B. anthracis* зачастую трудно снимаются петлей с поверхности агара, в то время как колонии близкородственных сапрофитов снимаются легко. Для выделения культуры, после просмотра под малым увеличением микроскопа, с питательного агара отбирают не менее 10 шероховатых колоний, при отсутствии такого количества – все шероховатые колонии.

При оценке морфологии колоний учитывают существование редких вариантов сибиреязвенного микроба II типа, формирующих слизистые колонии в SM-форме на обычных питательных средах (приложение 8 к настоящим МУ).

7.18. Оценка характера роста (культурально-морфологических свойств) на селективной дифференциально-диагностической среде. Посевы на селективной дифференциально-диагностической среде с фенолфталеинфосфатом натрия перед просмотром обрабатывают парами аммиака. Для этого в отдельную крышку от чашки Петри помещают фильтровальную бумагу и наливают на нее 1 – 2 мл аммиака водного (29 % концентрированного). Затем чашку с посевами (агаром вверх) без крышки помещают на 5 – 10 с в крышку с аммиаком. Таким образом обрабатывают все посевы.

В силу того, что сибиреязвенный микроб не образует или продуцирует фосфатазу слабо, его колонии, как правило, не изменяют своего цвета. Колонии спорообразующих сапрофитов, в том числе и *B. cereus*, под действием паров аммиака приобретают розовый или красный цвет. С дифференциально-диагностической среды для выделения чистой культуры отбирают визуально и с помощью микроскопа при малом увеличении все колонии, не изменившие своего цвета после обработки парами аммиака или слабо порозовевшие.

При использовании селективной дифференциально-диагностической среды с динатриевой солью пара-нитрофенилфосфата обработка парами аммиака не требуется. Колонии отбирают с характерной морфологией с неизменным цветом агара вокруг них, т.е. фосфатазонегативные колонии. Толща агара вокруг колоний фосфатазопозитивных близкородственных бацилл окрашивается в желтый цвет.

7.19. Для контроля выделенной культуры используют бактериоскопический и ПЦР методы. Из отобранных колоний готовят мазки на двух или более предметных стеклах. Мазки фиксируют и окрашивают двумя способами – по Ребигеру (или по Граму) и иммуноглобулинами диагностическими флуоресцирующими адсорбированными сибиреязвенными вегетативными. При просмотре мазков учитывают характерную для сибиреязвенного микроба

морфологию (длинные нити, концы палочек обрублены), при окраске флуоресцирующими иммуноглобулинами – специфическое свечение на 4+ или 3+. Проводят ПЦР-идентификацию колоний с характерной для сибиреязвенного микроба морфологией.

Для отсева с целью получения чистой культуры и дальнейшей идентификации отбирают колонии, которые по результатам микроскопии состоят из характерных для сибиреязвенного микроба палочек и дают положительный результат при ПЦР-идентификации. Их отсевают на МПА или агар Хоттингера для получения чистой культур изолированных колоний, а также на жидкую питательную среду – МПБ, бульон Хоттингера (рН 7,2) или LB-бульон.

Посевы инкубируют 18 – 24 ч, после чего проводят учет и идентификацию по полной схеме лабораторного исследования.

Биологический метод

7.20. При исследовании материала биологическим методом используется оборудование и расходные материалы в соответствии с приложением 5 к настоящему МУ.

7.21. Для постановки биологической пробы используют белых беспородных мышей (массой 18 – 20 г), морских свинок (массой 350 – 400 г) или золотистых хомяков (массой 60 – 80 г). Исследуемый материал, подготовленный в соответствии п.п. 6.1 – 6.15, суспендируют в небольшом объеме стерильного 0,9 % раствора хлорида натрия и вводят подкожно во внутреннюю поверхность бедра 2 мышам в объеме 0,2 – 0,5 мл, 2 морским свинкам или 2 золотистым хомякам – в объеме 0,5 – 1,0 мл. Гибель зараженных животных наступает через 1 – 3 суток, иногда позже.

При вскрытии трупов биопробных животных, павших от сибирской язвы, отмечают характерный для сибиреязвенной инфекции студенистый геморрагический отек подкожной клетчатки на месте введения материала, гиперемия внутренних органов, увеличение селезенки и несвернувшуюся кровь. Из тканей и органов павших животных делают мазки-отпечатки, а также посевы на МПА, агар Хоттингера или LB-агар и селективную среду. Мазки-отпечатки фиксируют в 95 – 96 % этиловом спирте с 3 % перекиси водорода в течение 30 мин, а затем окрашивают раствором по Ребигеру или метиленовой синькой. В мазках при микроскопии сибиреязвенные бациллы расположены короткими цепочками, попарно или поодиночке, окружены розовой капсулой, зачастую сливающейся вокруг групп микробов. В посевах при просмотре чашек вырастают крупные шероховатые колонии с бахромчатой периферией. Идентификацию выросших колоний проводят вышеописанными методами.

В случаях, когда культура возбудителя из посевов исходного материала на питательные среды получена раньше, чем наступает гибель зараженных этим материалом животных, дополнительно заражают двух мышей или морских свинок суточной бульонной культурой или суспензией агаровой культуры в стерильном 0,9 % растворе хлорида натрия в объемах, указанных выше.

Наблюдение за животными ведут в течение десяти суток, после чего их исследуют, как описано выше. В целях ускорения исследования количество

заражаемых белых мышей увеличивают до 6 – 10 особей и через 2 – 3 суток после введения исходного инокулюма умерщвляют по одной мыши из каждой пробы. В этом случае при вскрытии особое внимание уделяют месту введения. Если в исходном материале имеется достаточное количество сибиреязвенного микроба, то на месте введения можно обнаружить отек подкожной клетчатки. В мазках-отпечатках с места введения микроб выявляется в капсульной форме, а в посевах определяется рост типичных колоний.

7.22. При ускоренной биопробе заражают внутрибрюшинно шесть белых мышей суточной бульонной культурой или суспензией агаровой культуры в стерильном 0,9 % растворе хлорида натрия в объеме 0,5 мл. По две мыши умерщвляют через 3, 6 и 9 ч. Мазки-отпечатки из органов (печень, селезенка) и перитонеального экссудата исследуют на наличие капсульной формы сибиреязвенного микроба в соответствии с п. 7.17.

Иммунологические методы исследования

7.23. При иммунологических исследованиях используется оборудование и расходные материалы в соответствии с приложением 5 к настоящему МУ.

7.24. Реакция преципитации по Асколи используется преимущественно в области ветеринарии и позволяет в короткие сроки обнаружить сибиреязвенный антиген в экстрактах из патологического материала животных, шкур, кожевенно-мехового и пантокринного сырья, мяса, а также у выделенных культур микроорганизмов (экспресс-метод идентификации). Исследованию в реакции Асколи подвергают, в том числе, и загнивший биоматериал. Для постановки реакции используются преципитирующая сибиреязвенная сыворотка, экстракт из исследуемого материала и сибиреязвенный бактериальный антиген для контроля.

Перед постановкой реакции свежий биоматериал выдерживают в термостате в течение 18 – 20 ч для накопления преципитиногенов. Экстрагирование проводят горячим и холодным способами. При этом следует учитывать, что в экстрактах, полученных горячим способом, меньше преципитиногенов.

Для получения экстракта из патологического материала и струсьев горячим способом лимфатические узлы и селезенку тщательно очищают от жировых включений и капсул, материал измельчают, заливают 0,9 % раствором натрия хлорида с 0,3 % карболовой кислоты в соотношении 1:10 и кипятят в течение 30 – 40 мин, при холодном способе – оставляют для экстрагирования на 16 – 18 ч при комнатной температуре. Полученные экстракты фильтруют до полной прозрачности через фильтровальную бумагу или вату, предварительно смоченные 0,9 % раствором хлорида натрия. Осветление экстрактов можно проводить путем их центрифугирования при 12000 об/мин в течение 1 мин или фильтрованием через стерилизующие фильтры с диаметром пор 0,45 мкм. В узкие пробирки наливают 0,2 – 0,3 мл прозрачной сибиреязвенной преципитирующей сыворотки, а затем пастеровской пипеткой или дозатором со стерильным наконечником осторожно наслаивают на нее такое же количество полученного экстракта. При правильном наслаивании (подслаивании) экстракта в пробирке должно

наблюдаться четкое разделение двух фаз жидкостей. Если произошло смешивание двух фаз, то реакцию переставляют в новой пробирке.

При поступлении в лабораторию материала от животных в консервированном состоянии (в 30 % растворе глицерина) и последующем приготовлении из него экстракта возможно увеличение плотности последнего, ввиду чего при постановке реакции Асколи методом наслоения экстракт будет опускаться на дно и смешиваться с преципитирующей сывороткой. В таком случае постановку реакции проводят методом подслаивания.

Если реакция положительная, то на границе соприкосновения жидкостей не позднее 15 мин появляется мутно-белое кольцо. Реакция оценивается знаком (+). При сомнительной реакции появление кольца наблюдается позднее 15 мин (\pm). Если кольцо отсутствует, то реакция оценивается как отрицательная (-). Одновременно необходимо ставить три контрольных пробы: 1) преципитирующая сыворотка с коммерческим стандартным сибирезвенным антигеном; 2) преципитирующая сыворотка с экстрагирующей жидкостью; 3) нормальная лошадиная сыворотка с коммерческим стандартным сибирезвенным антигеном. Все контроли, кроме первого, должны быть отрицательными. При получении сомнительных результатов реакции Асколи целесообразно дополнительно произвести постановку реакции с преципитирующей сывороткой другой серии.

Для исследования в реакции Асколи кожи ушей павших животных и пантов при помощи ножниц и пинцетов проводят отделение кожи уха от хряща и ворсистой кожи вместе с волокнистой тканью от трубчатой структуры мозгового слоя у пантов. Кожу отпрепаровывают на выпуклой задней поверхности ушной раковины (спинки).

Участки кожи с шерстью опаливают над пламенем горелки. На салфетке, смоченной дезинфицирующим раствором, при помощи скальпеля удаляют остатки опаленной шерсти. Если в лабораторию уши и панты поступили консервированными в 30 % водном растворе глицерина, то их обмакивают фильтровальной бумагой или марлевыми салфетками для удаления излишков глицерина. Шерсть и ворсинки удаляют при помощи ножниц.

Фрагмент кожи массой примерно 1,0 г мелко нарезают в 2 стерильные стеклянные пробирки и помещают в термостат на 18 – 20 ч при температуре плюс $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Процедуру приготовления экстрактов горячим и холодным способами проводят, как описано выше.

Исследование кожевенного и мехового сырья на сибирскую язву в реакции преципитации по Асколи проводят в соответствии с ветеринарными правилами⁵⁸.

Необходимо учитывать, что применяемые в настоящее время различные виды кислот и щелочей для выделки кожевенного сырья могут влиять на

⁵⁸ Глава V Ветеринарных правил осуществления профилактических, диагностических, лечебных, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов сибирской язвы, утвержденных приказом Минсельхоза России от 23.09.2021 № 648 (зарегистрирован Минюстом России 29.10.2021, регистрационный № 65634) (далее – ветеринарные правила осуществления профилактических, диагностических, лечебных, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов сибирской язвы).

результаты реакции преципитации. Оптимальное значение рН экстрактов находится в пределах 6,0 – 8,0. Данный метод также характеризуется недостаточно высокой чувствительностью, так как нередко дает отрицательный результат при исследовании материала, заведомо содержащего возбудитель сибирской язвы, и характеризуется специфичностью 70 %, что иногда приводит к получению ложноположительных результатов ввиду наличия перекрестно-реагирующих антигенов у представителей группы *B. cereus*. В связи с этим результаты реакции Асколи подтверждаются либо выделением чистой культуры возбудителя, либо обнаружением специфических фрагментов генома *B. anthracis* в ПЦР (при исследовании загнившего материала).

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

7.25. Выявление противосибиреязвенных антител в сыворотках крови больных людей непрямым МФА относится к дополнительным методам диагностики и проводится в Референс-центре по мониторингу за возбудителем сибирской язвы.

Для постановки нМФА используют сыворотку диагностическую антивидовую против иммуноглобулинов человека люминесцирующую сухую. Для получения вегетативной культуры сибиреязвенного микроба используют споры вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1, которые засевают на чашку с агаром Хоттингера (рН 7,2) и инкубируют в термостате при температуре плюс (36 ± 1) °С в течение 18 – 24 ч. После этого готовят суспензию вегетативных клеток в 0,9 % растворе натрия хлорида в соответствии со стандартным образцом мутности бактериальных взвесей ОСО (далее – ОСО) 42-28-85 (10 МЕ), эквивалентных $0,11 \times 10^9$ спор/мл для спор сибиреязвенного микроба. Полученную суспензию тщательно встряхивают и готовят из нее мазки на предметных хорошо обезжиренных стеклах, по 8 мазков на каждом стекле. Мазки высушивают на воздухе, фиксируют 30 мин в 95 – 96 % этиловом спирте с 3 % перекиси водорода, вновь высушивают, при необходимости возможно расчерчивание стекол восковым карандашом. Для проведения анализа рекомендуется использовать свежеприготовленные мазки, при необходимости их можно хранить в холодильнике при температуре плюс 2 – 8 °С в закрытых чашках Петри не более 3 суток.

Исследуемую сыворотку от больного человека инактивируют в твердотельном термостате при температуре плюс (56 ± 1) °С в течение 20 мин. В качестве отрицательного контроля используют сыворотку здорового человека, которую обрабатывают аналогичным образом. Затем сыворотки титруют в пробирках или полистироловых планшетах в 0,9 % растворе натрия хлорида с двукратным шагом, отбирают с помощью пастеровской пипетки, начиная с большего разведения, и наносят капли на мазки с вегетативной культурой сибиреязвенного микроба. Стекла помещают на дно чашки Петри, закрывают крышкой и выдерживают 20 – 30 мин при температуре плюс (36 ± 1) °С. Затем

мазки промывают дважды по 10 мин в забуференном 0,9 % растворе натрия хлорида и 10 мин в дистиллированной воде. Стекла сушат на воздухе при комнатной температуре, после чего на мазки наносят люминесцирующую сыворотку против иммуноглобулинов человека в рабочем титре, обозначенном на ампуле. Мазки окрашивают и промывают в соответствии с п. 7.14. Микроскопию проводят с иммерсионной системой. Для оценки интенсивности свечения используют четырехкрестовую систему. Положительным результатом считается свечение на 3+ и 4+ в диагностическом титре 1:40 и выше.

У лиц, больных сибирской язвой, специфические антитела начинают появляться уже с 5 суток после начала болезни, и их титр нарастает до 21 и более суток. Увеличение титра антител можно проследить при исследовании парных сывороток с интервалом 5 – 7 дней. В нМФА титры антител могут достигать до 1:640 – 1:1280, диагностическим считается 2 кратное нарастание титров при повторном исследовании.

7.26. Для выявления противосибирезвенных антител в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА, микрометод) в сыворотках больных людей используется эритроцитарный антигенный диагностикум. РНГА в ветеринарии используется исключительно с целью оценки поствакцинального иммунитета. Исследование материала проводится в соответствии с инструкцией производителя по применению набора.

7.27. Выявление специфических иммуноглобулинов в сыворотке крови людей методом ИФА проводят в соответствии с инструкцией производителя по применению набора.

7.28. При подозрении на наличие высокой концентрации спор возбудителя сибирской язвы в объектах окружающей среды (1×10^8 спор/мл в пробе) применяется иммунохроматографический тест для выявления спор *B. anthracis*. Исследование образцов проводится в соответствии с инструкцией производителя по применению набора.

7.29. С целью выявления антител к спектру антигенов сибирезвенного микроба и антигенов возбудителя сибирской язвы могут использоваться панели специфических антигенов и специфических моноклональных (поликлональных) антител к *B. anthracis* соответственно. Исследование проводится с применением иммуночипов согласно инструкции производителя по применению набора.

7.30. Определение аллергической перестройки организма проводят с использованием теста антигенной активации базофилов *in vitro* с учетом реакции методом проточной цитофлуориметрии. Тест относится к дополнительным методам диагностики и проводится в Референс-центре по мониторингу за возбудителем сибирской язвы. Организм больного, переболевшего сибирской язвой, а также иммунизированного против этой инфекции, обладает свойством отвечать аллергической реакцией при контакте с сибирезвенным антигеном-аллергеном. Эта реакция может появляться уже с первых дней и наблюдается у подавляющего числа больных с конца первой недели заболевания. Аллергическая перестройка организма у переболевших сибирской язвой может сохраняться длительное время, что позволяет использовать аллерген не только для диагноза текущего заболевания, но и для ретроспективной диагностики.

Определение аллергической перестройки организма проводят в условиях *in vitro* с помощью набора для постановки тестов антигенной активации базофилов, который может применяться для определения *in vitro* аллергической реакции немедленного типа и гиперчувствительности к предполагаемым антигенам. Тесты используются для определения экспрессии трансмембранного белка кластера дифференциации 63 (далее – CD63) на поверхности специализированных эффекторных клеток (базофилов) цельной крови методом проточной цитофлуориметрии после стимуляции сибиреязвенным антигеном.

Подготавливают три отдельные пробирки для проточного цитометра: фоновая проба – вносят 50 мкл стимулирующего буфера; положительный контроль – 50 мкл положительного контроля; проба с аллергеном – 50 мкл антраксина. Во все пробирки вносят по 100 мкл стимулирующего буфера и добавляют 50 мкл исследуемой стабилизированной гепарином или ЭДТА крови, перемешивают на вортексе в течение 10 с. Во все пробирки добавляют 20 мкл суспензии моноклональных антител против антигенов базофилов человека – CD63, конъюгированных с флуоресцеинизотиоцианатом (анти-CD63-FITC), и к хемокиновому рецептору CCR, меченному фикоэритрином (анти-CCR3-PE), перемешивают на вортексе и инкубируют 15 мин на водяной бане при температуре плюс (36 ± 1) °С. Во все пробирки добавляют 2,0 мл предварительно прогретого до температуры плюс 25 – 28 °С лизирующего раствора в разведении 1:10, инкубируют 5 – 10 мин при температуре плюс 18 – 28 °С, центрифугируют 5 мин при 2000 об/мин, удаляют супернатант, добавляют 450 мкл отмывочного буфера и перемешивают на вортексе в течение 10 с.

Анализ пробы проводят на проточном цитометре с помощью программ для оценки результатов цитометрического анализа (время анализа 2 – 3 ч).

При учете результатов из процента базофилов, экспрессирующих рецепторы к CD63 в пробе с аллергеном, вычитают процент активированных базофилов, полученный в фоновой пробе, полученная разница и является искомым результатом.

Оценка результатов: от 0 до 10 % – отрицательная реакция; > 10 % – положительная реакция.

VIII. Идентификация выделенных культур

8.1. Все выделенные культуры, подозрительные на принадлежность к *B. anthracis*, подвергают дальнейшему изучению свойств, служащих критерием видовой идентификации, а при необходимости дополнительных свойств, являющихся основой для внутривидового типирования.

8.2. Тесты разделены на три группы (приложение 9 к настоящим МУ). Тест группы I является ускоренным идентификационным и одновременно позволяющим дифференцировать изолированные штаммы по плазмидному составу методом ПЦР. Тесты группы II являются основными, тесты группы III – дополнительными методами изучения выделенных сибиреязвенных культур.

Молекулярно-генетическая идентификация штаммов *B. anthracis* (тест группы I)

8.3. Молекулярно-генетическую идентификацию и установление эпидемического потенциала выделенных культур проводят методом ПЦР. Предварительная обработка проб проводится в соответствии с п. 6.16. Работу проводят в соответствии с инструкциями к наборам для экстракции ДНК и ПЦР тест-системам.

Основные идентификационные тесты (тесты группы II)

8.4. В мазках из 18–24-часовых бульонных и агаровых культур вегетативные клетки имеют форму палочек, расположенных длинными цепочками. Концы бацилл в окрашенных препаратах обрублены и вогнуты, отчего цепочка напоминает бамбуковую трость с коленчатыми сочленениями. В мазках из бульонной культуры с диффузным ростом обнаруживаются отдельные или парно расположенные палочки. В мазках по Граму бациллы сибирской язвы окрашиваются положительно. Споры имеют овальную форму, внутри бактериальной клетки образуется одна спора, располагающаяся центрально, не превышая диаметра тела микробной клетки. Размеры вегетативных клеток сибиреязвенного микроба $1,0 - 1,5 \times 6,0 - 10,0$ мкм, спор – $0,8 - 1,0 \times 1,5$ мкм (приложение 10 к настоящим МУ).

Морфологию спор определяют в мазках после окрашивания, например, по Ребигеру, Ауэски, Пешкову, Цилю-Нильсену при исследовании культуры, полученной на плотной питательной среде при культивировании в течение 3–7 суток. Для дифференциации от других грамположительных бацилл мазки окрашивают иммуноглобулинами диагностическими флуоресцирующими сибиреязвенными споровыми, ориентируясь при микроскопии на морфологию клеток и специфическое свечение (ярко-зеленая периферия и более темная сома клеток).

Приготовленные мазки фиксируют в фиксирующей жидкости, содержащей перекись водорода (приложение 6 к настоящим МУ).

8.5. Характер роста на плотных питательных средах определяют визуально невооруженным глазом или под микроскопом, для чего чашку помещают на столик микроскопа вверх дном и просматривают колонии в проходящем свете при малом увеличении и с суженной диафрагмой. Оценивают колонии по их морфологии: величине, форме, виду, цвету, характеру поверхности и края, прозрачности, структуре, консистенции.

На МПА, агаре Хоттингера, LB-агаре возбудитель сибирской язвы формирует крупные шероховатые матовые серые сухие колонии в R-форме с «шагреновой» поверхностью, неровными краями и отходящими от них волнистыми отростками, напоминающими при просмотре в микроскопе (малое увеличение) локоны волос или львиную гриву. Колонии сибиреязвенного микроба на плотных питательных средах отличаются от колоний спорообразующих сапрофитов меньшими размерами, большей шероховатостью и более выраженными «локонами» по периферии. Колония сибиреязвенного микроба с

трудом снимается бактериологической петлей, при этом за петлей поднимается тяж бактериальной массы.

При использовании дифференциально-диагностической среды с фенолфталеинфосфатом натрия или динатриевой солью пара-нитрофенилфосфата учитывают одновременно два важных диагностических признака – морфологию выросших колоний и тест на щелочную фосфатазу.

В жидких питательных средах (МПБ, бульоне Хоттингера, LB-бульоне) сибирезвенный микроб растет в виде придонного «комочка ваты», бульон над которым остается прозрачным. «Комочек ваты» бульонной культуры *B. anthracis* с трудом разбивается при встряхивании, в отличие от подобного придонного роста некоторых представителей спорообразующих сапрофитов, легко разбивающегося и вызывающего помутнение среды. В отдельных случаях в бульоне появляется диффузный рост культуры *B. anthracis* (легкое помутнение), при встряхивании образуются муаровые волны, на поверхности бульона может наблюдаться рост в виде пристеночного кольца (приложение 10 к настоящим МУ).

8.6. Тест на щелочную фосфатазу проводят в соответствии с п. 7.18.

8.7. Одним из наиболее постоянных для сибирезвенного микроба признаков является отсутствие подвижности, в отличие от большинства спорообразующих сапрофитов.

Подвижность определяют путем посева культуры уколом в столбик полужидкого агара (0,4 – 0,7 %) или тиогликолевой среды. Посевы выдерживают в термостате при температуре плюс (36 ± 1) °С в течение 18 – 24 ч. Рост сибирезвенного микроба наблюдается только по следу укола, а окружающая среда остается прозрачной. Подвижные микробы дают диффузный рост.

Простым методом определения подвижности является микроскопическое исследование в «висячей» или «раздавленной» капле, а также в камере Горяева 18 – 24-часовых бульонной культуры. Описаны и неподвижные варианты *B. cereus* и других сапрофитов.

8.8. Обнаружение капсулы *in vitro* проводят посевом культур на 1 % бикарбонатно-сывороточном агаре (приложение 7 к настоящим МУ). Инкубацию на 1 % бикарбонатно-сывороточном агаре проводят при температуре плюс (36 ± 1) °С и содержании 5 – 50 % CO_2 в анаэроостате, CO_2 -инкубаторе или в эксикаторе с притертой крышкой. При использовании эксикатора на его дно помещают 0,4 г натрия двууглекислого (пищевой соды) и наливают 0,35 мл концентрированной соляной кислоты или 2 г NaHCO_3 + 10 мл 20 % серной кислоты (H_2SO_4) (на каждый литр объема эксикатора). После внесения чашек Петри с посевами эксикатор закрывают крышкой и слегка наклоняют, соединяя натрий двууглекислый с кислотой. Просматривают посевы через 18 – 24 ч.

Капсулообразующие культуры вырастают в виде крупных гладких блестящих слизистых колоний. В мазках, окрашенных после их фиксации одним из методов (по Ребигеру, иммуноглобулинами диагностическими флуоресцирующими сибирезвенными вегетативными), видны цепочки палочек, окруженных хорошо выраженной капсулой (приложение 10 к настоящим МУ). Для контроля качества сред и условий культивирования таким же образом проводят посевы капсулообразующего штамма *B. anthracis*, например, второй вакцины Ценковского.

8.9. При вскрытии биопробных животных, которым введена исследуемая культура, делают мазки из перитонеального экссудата, крови из сердца и мазки-отпечатки из органов. Мазки фиксируют и окрашивают по Ребигеру или метиленовой синькой. В мазках от животных микробы расположены короткими цепочками, попарно или поодиночке, окружены розовой капсулой. Способность к капсулообразованию *in vivo* из всех представителей рода *Bacillus* присуща только возбудителю сибирской язвы. Встречающиеся в природе атипичные штаммы, не образующие капсулу, но по другим тестам соответствующие сибиреязвенному микробу, требуют дополнительных исследований.

8.10. Возбудитель сибирской язвы лизируется сибиреязвенными фагами (например, «Гамма», «К», R/D-Ph-6, Fah-ВНИИВВиМ). Перед постановкой пробы свежеприготовленные чашки с агаром Хоттингера, МПА или LB-агаром (рН 7,2) подсушивают в термостате при температуре плюс $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$. Расчерчивают дно чашки снаружи на квадраты со стороной 2 см. Бактериологической петлей или пипеткой на каждый квадрат наносят каплю 5 – 6-часовой бульонной культуры сибиреязвенного микроба. Чашку с приоткрытой крышкой подсушивают 30 мин в термостате при температуре плюс $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$, а затем в центр подсохшей капли наносят петлей каплю цельного сибиреязвенного бактериофага. Результаты учитывают через 5 – 6 ч инкубации чашек при температуре плюс $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$, просматривая их под малым увеличением микроскопа. В более поздние сроки через 12 – 24 ч просматривают чашки невооруженным глазом. В случае положительного результата на месте нанесения капли бактериофага наблюдается полное или частичное отсутствие роста в виде округлого просветления (приложение 10 к настоящим МУ). Допускается постановка пробы с фагом методом стекающей капли в пробирках или чашках с агаром Хоттингера, МПА или LB-агаром. Постановка пробы с фагом методом стекающей капли или «фаговой дорожки» проводится посевом сплошным газоном на чашках с агаром Хоттингера, МПА или LB-агаром. На верхнюю точку посева наносят каплю фага и дают стечь вдоль посева. Учет результатов можно провести через 12 – 18 – 24 ч инкубации при температуре плюс $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$.

В связи с тем, что диагностические сибиреязвенные бактериофаги обладают неравноценной чувствительностью и специфичностью, а также различной ферментативной активностью (амидазной, пептидазной, лизоцимной), целесообразно определять чувствительность выделенных культур к 2 – 3 фагам.

8.11. Для проведения теста на гемолиз готовят агар Хоттингера, МПА или LB-агар (рН 7,2) с 3 – 5 % дефибрированной крови барана (приложение 7 к настоящим МУ). Посев испытуемых культур производят бактериологической петлей отдельными секторами и инкубируют в термостате при температуре плюс $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 18 – 20 ч, после чего учитывают результат. В эти сроки сибиреязвенный микроб не лизирует эритроциты барана в отличие от большинства родственных спорообразующих сапрофитов, образующих широкую зону гемолиза вокруг выросших колоний. Гемолиз через 20 – 24 ч может наблюдаться у отдельных штаммов сибиреязвенного микроба.

8.12. При постановке теста на чувствительность к пенициллину используют один из методов.

Для определения чувствительности с использованием теста «жемчужного ожерелья» к бульону Хоттингера (рН 7,2) стерильно добавляют 20 % инактивированной лошадиной сыворотки, 0,05 и 0,5 ЕД/мл пенициллина. Среды разливают с соблюдением стерильности в пробирки по 2 – 3 мл и засевают по 2 капли бульонной или петлю агаровой культуры, взятой для исследования. Пробирки с посевами инкубируют 2,5 – 3 ч при температуре плюс $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$. Затем делают мазки, их фиксируют и окрашивают по Ребигеру или метиленовой синькой (приложение 10 к настоящим МУ).

При исследовании чувствительности к пенициллину диско-диффузионным методом (далее – ДДМ) из колоний суточных агаровых культур готовят взвесь микробов на 0,9 % растворе натрия хлорида, доводя плотность инокулюма в соответствии со стандартным образцом мутности бактериальных взвесей ОСО 42-28-85 (10 МЕ). Эту взвесь в объеме 0,3 мл наносят на поверхность питательной среды Мюллера-Хинтона или агара Хоттингера (рН 7,2) и равномерно распределяют шпателем. Чашки выдерживают 15 мин при комнатной температуре для впитывания жидкости. Затем на поверхность засеянной питательной среды пинцетом накладывают коммерческий диск с 10 мкг пенициллина. Посевы выдерживают 15 мин при комнатной температуре, а затем, перевернув чашки вверх дном, инкубируют при температуре плюс $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение не более 18 – 20 ч. Измеряют диаметр зон задержки роста вокруг дисков, включая диаметр самого диска, с точностью до 1 мм. Мелкие колонии в пределах зоны задержки роста не учитывают. При расплывчатых краях зоны или при зонах с двойными контурами измеряют диаметр зоны по наиболее четкой границе. Типичные штаммы сибиреязвенного микроба, чувствительные к пенициллину, характеризуются зоной задержки роста 26 мм и больше, большинство близкородственных сапрофитов – 16 мм и меньше.

Дополнительные методы изучения выделенных культур *B. anthracis* (тесты группы III)

8.13. Наличие или отсутствие лецитиназной активности определяют в жидкой желточной среде, на агаре Хоттингера (рН 7,2), в который стерильно добавлен желток куриного яйца, или на агаровой питательной среде, содержащей 0,2 – 0,4 % лецитина. В пробирки с 5 мл жидкой желточной среды (приложение 7 к настоящим МУ) засевают петлей суточную культуру микроорганизма и инкубируют в термостате при температуре плюс $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$. Возбудитель сибирской язвы, как правило, в течение нескольких суток инкубирования не свертывает желток, в то время как представители спорообразующих сапрофитов свертывают желток уже в первые сутки. На плотной питательной среде вокруг колоний сибиреязвенного микроба не формируется зона ферментации желтка, в то время как вокруг колоний большинства сапрофитов, вырабатывающих активную лецитиназу, просматривается широкая беловатая непрозрачная зона (приложение 10 к настоящим МУ).

8.14. Большинство природных штаммов *B. anthracis* чувствительны ко многим используемым в практике антибиотикам. Однако встречаются и природные штаммы, которые в той или иной степени устойчивы к различным

антибактериальным препаратам, что затрудняет проведение лечебных мероприятий в случае заражения таким штаммом. Определение чувствительности штаммов сибиреязвенного микроба, выделенных от больных, является необходимой мерой для выбора наиболее эффективного препарата для лечения тяжелых форм сибирской язвы.

Для определения чувствительности *B. anthracis* к антибактериальным препаратам используется метод серийных разведений антибиотиков или ДДМ.

При определении чувствительности сибиреязвенного микроба с помощью ДДМ используют типичные колонии из 18-часовых агаровых культур. Из выросших колоний готовят взвесь микробов в 0,9 % растворе натрия хлорида, доводя плотность инокулюма в соответствии со стандартным образцом мутности бактериальных взвесей ОСО 42-28-85 (10 МЕ). Эту взвесь в объеме 0,3 мл наносят на поверхность питательной среды Мюллера-Хинтона, АГВ или агара Хоттингера (рН 7,2) и равномерно распределяют шпателем. Чашки выдерживают 15 мин при комнатной температуре для впитывания жидкости. Диски накладывают пинцетом на поверхность засеянной питательной среды на одинаковом расстоянии один от другого, отступив около 2 см от стенки чашки (не более 4 дисков), выдерживают 15 мин при комнатной температуре, а затем, перевернув их вверх дном, инкубируют при температуре плюс $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 18 – 20 ч (не более). Измеряют диаметр зон задержки роста вокруг дисков, включая диаметр самого диска, с точностью до 1 мм (приложение 10 к настоящим МУ). Мелкие колонии в пределах зоны задержки роста не учитывают. При расплывчатых краях зоны или при зонах с двойными контурами измеряют диаметр зоны по наиболее четкой границе (приложение 10 к настоящим МУ).

Допускается использовать метод определения чувствительности к антибиотикам с помощью Е-тестов. Е-тесты представляют собой бумажные полоски, пропитанные убывающими концентрациями определенного антибиотика (128, 64, 32, 16, 8, 4 ... мкг/см³). На обе стороны полоски нанесена шкала минимальной подавляющей концентрации (далее – МПК) в мкг/мл и напечатан символ антибиотика. Е-тесты, помещают на поверхность агаровой среды, засеянной испытуемой культурой в виде «газона». После инкубирования вокруг полоски формируется эллипсовидная зона задержки роста, которая сужается в области малых концентраций и пересекает полоску на уровне, соответствующем величине МПК (приложение 11 к настоящим МУ).

Для метода серийных разведений используют суспензию той же концентрации микробных клеток, наносят ее небольшими каплями с помощью штампа-репликатора или касанием пипетки с тонким концом на агаровые пластинки среды Мюллера-Хинтона или агара Хоттингера (рН 7,2) с разными концентрациями антибактериальных препаратов, начиная с чашек с минимальным содержанием антибиотиков. Посевы инкубируют 18 – 24 ч при температуре плюс $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$. С помощью штампа-репликатора можно одновременно изучить антибиотикограммы 50 культур, что значительно экономит средства и время. Чувствительность (устойчивость) культур определяют по МПК препарата (мг/л или мкг/мл), угнетающей рост возбудителя на среде культивирования.

Интерпретацию результатов проводят путем их сопоставления с пограничными значениями МПК и диаметров зон подавления роста возбудителя

(приложение 11 к настоящим МУ). В таблице даны пограничные значения МПК и зон подавления роста для чувствительных и устойчивых культур. Между этими показателями находятся значения для культур с промежуточной устойчивостью. Необходимо учитывать результаты определения МПК и зон подавления роста для контрольных штаммов *B. anthracis* СТИ-1 и *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 на данной серии питательной среды. Изменения МПК и диаметров зон подавления роста для контрольных штаммов, выходящие за пределы допустимых значений, могут свидетельствовать о несоответствии качества сред или дисков с антибактериальными препаратами и потребовать их замены. Увеличение МПК для исследуемых штаммов по сравнению с контрольным штаммом *B. anthracis* СТИ-1 может свидетельствовать о тенденции к нарастанию устойчивости культур, что требует изменения схемы терапии и использования для лечения и профилактики другого, более эффективного антибактериального препарата.

В паспорте штамма указывают значения МПК и диаметры зон подавления роста для всех исследованных препаратов с интерпретацией результатов исследования: культура чувствительна, устойчива или имеет промежуточную устойчивость.

8.15. Для определения гемолитической и протеолитической активности готовят двухслойный агар, используя в качестве первого слоя 1 % микробиологический (бактериологический) агар на 0,9 % растворе хлорида натрия, который разливают в чашки Петри по 20 мл. Для второго слоя готовят 0,7 % агар на 0,9 % растворе хлорида натрия, в который после охлаждения вносят следующие ингредиенты: для проверки гемолитической активности – 6 % трижды стерильно отмытых в 0,9 % растворе хлорида натрия эритроцитов барана; для определения протеолитической активности – отдельно каждый из следующих компонентов: желатин, казеин, бычий сывороточный альбумин и гемоглобин в концентрации 0,4 %. После полного застывания верхнего слоя в агаровых пластинках пробойником делают по 6 – 7 лунок в каждой чашке, дно которых заливают каплей расплавленного 1 % микробиологического (бактериологического) агара.

В лунки вносят по 0,1 мл двухсуточной бульонной культуры изучаемых штаммов. Учет производят через 48 ч инкубации при температуре плюс $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ для выявления гемолитической и через 24 ч – для выявления протеолитической активности. В последнем случае перед просмотром поверхность агара обрабатывают 20 % раствором трихлоруксусной кислоты. При положительном результате вокруг лунок с культурой в агаре образуются зоны просветления.

8.16. Для определения дополнительных питательных потребностей готовят минимальную питательную среду «9АТ» (приложение 7 к настоящим МУ). Споры изучаемых штаммов засевают на среду «9АТ» и выращивают в течение 24 – 48 ч при температуре плюс $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$. Для контроля засевают на эту среду споры типичного штамма (например, *B. anthracis* 81/1). Если исследуемые штаммы не растут на этой среде через 48 ч, то их можно считать нуждающимися в дополнительных факторах роста, чаще в триптофане, фенилаланине, тирозине.

8.17. Метод дифференциации культур сибиреязвенного микроба по вирулентности *in vitro* основан на объективной регистрации различий в продукции разными культурами капсулы и экзотоксина при культивировании на

агаре Хоттингера (рН 7,2) в воздушной атмосфере и на среде для сочетанного определения продукции экзотоксина и капсулы (далее – «СОПЭК») (приложение 6 к настоящим МУ) в атмосфере, обогащенной CO_2 . Капсулообразование регистрируется по характерному росту на плотных средах в виде гладких слизистых колоний, в мазках из которых при микроскопии обнаруживаются капсульные бациллы. Учет токсинообразования ведется по визуально наблюдаемым концентрическим ореолам иммунопреципитации в среде вокруг колоний, продуцирующих токсин. Иммунопреципитация в данном методе является следствием взаимодействия антитоксических антител противосибиреязвенного глобулина, введенного в состав среды, и диффундирующих в среду компонентов токсина, который синтезируется сибиреязвенным микробом при культивировании на среде в атмосфере с повышенным содержанием CO_2 . Все это позволяет дифференцировать культуры с обычной, то есть CO_2 -зависимой, CO_2 -независимой продукцией капсулы, бескапсульные, продуцирующие и не продуцирующие токсин. Среди них выделяют пять групп, в зависимости от характера экспрессии капсулы и токсина, которым соответствуют следующие степени патогенности: высоковирулентные, умеренно вирулентные, слабовирулентные, авирулентные и апатогенные.

Для исследования готовят суспензию спор или вегетативных клеток из суточных агаровых культур в соответствии со стандартным образцом мутности бактериальных взвесей ОСО 42-28-85 (10 МЕ). Взвесь наносят петлей бляшками диаметром 3 – 4 мм от 10 до 50 инокулятов параллельно на одну чашку со средой «СОПЭК» и одну чашку с агаром Хоттингера. Для контроля качества среды засевают культуру типичного по капсуло- и токсинообразованию тест-штамма, любого бесплазмидного штамма, а также штамма с CO_2 -независимой продукцией капсулы.

Чашки со средой «СОПЭК» помещают в микроанаэростат или CO_2 -инкубатор. Из микроанаэростата вакуумным насосом откачивают 25 % воздуха, ориентируясь на показания мановакуумметра, и замещают его CO_2 из баллона. Для создания необходимых условий инкубации в микроанаэростате также можно использовать газогенерирующие пакеты. В CO_2 -инкубаторе чашки культивируют с 10 % CO_2 . Посевы на среде «СОПЭК» выращивают при температуре плюс $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 48 ч, затем переносят чашки из микроанаэростата или CO_2 -инкубатора в холодильник и выдерживают в течение 1 – 3 суток при температуре плюс 2 – 8 $^\circ\text{C}$. Чашки с агаром Хоттингера инкубируют при температуре плюс $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ в обычной воздушной атмосфере в течение 24 ч.

По окончании указанных сроков инкубации (24 ч для агара Хоттингера и 48 ч для среды «СОПЭК») просматривают чашки, регистрируя морфологию колоний. Продуцирующие капсулу культуры формируют колонии в SM-форме – округлые, гладкие, блестящие, со слизистым капсульным веществом на поверхности. Не продуцирующие капсулу культуры растут в R-форме в виде шероховатых, с волокнистым краем матовых колоний.

Для подтверждения факта образования капсулы из колоний делают мазки для микроскопии, которые окрашивают раствором по Ребигеру в течение 15 – 20 с, промывают и высушивают. Капсула окрашивается в розовый цвет или остается неокрашенной, бактерии – в темно-фиолетовый цвет.

По истечении 48 ч после начала инкубации чашки со средой «СОПЭК» просматривают при естественном освещении на черном фоне (используют для этого лист черной бумаги) и отмечают предварительные результаты. Вокруг продуцирующих токсин колоний в среде формируются концентрические ореолы иммунопреципитации в виде белых тонких колец. Не продуцирующие токсин колонии лишены таких ореолов. После выдерживания посевов на среде «СОПЭК» в холодильнике в течение 1–3 суток их просматривают повторно и проводят окончательный учет результатов.

Результаты интерпретируют следующим образом: культуры относят к высоковирулентным, если они продуцируют капсулу и токсин в атмосфере CO_2 и не продуцируют капсулу на воздухе; умеренно вирулентным – если они не продуцируют токсин, продуцируют капсулу в атмосфере CO_2 и не продуцируют ее на воздухе; слабовирулентным – если они не продуцируют токсин и продуцируют капсулу в атмосфере CO_2 и на воздухе; авирулентным – если они продуцируют токсин, но не продуцируют капсулу; апатогенным – если они не продуцируют ни капсулу, ни токсин.

С целью дифференциации культур *B. anthracis* по вирулентности *in vitro* также может быть использована следующая методика сочетанного определения продукции экзотоксина и капсулы. Готовят среду на основе агар Хоттингера (рН 7,2), к которой добавляют 1 % соды и 10 % инактивированной лошадиной сыворотки (приложение 7 к настоящим МУ). Подготавливают полоски фильтровальной бумаги размером примерно $1,5 \times 8$ см, которые стерилизуют в автоклаве при температуре плюс 121°C в течение 20 мин. Затем полоски пропитывают неразведенным противосибиреязвенным глобулином жидким и накладывают на поверхность застывшего агара в чашках Петри, после чего чашки подсушивают в течение 30 мин при температуре плюс $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$. Суспензии суточных вегетативных агаровых культур изучаемых штаммов, подготовленные в соответствии со стандартным образцом мутности бактериальных взвесей ОСО 42-28-85 (10 МЕ), засевают по обеим сторонам полоски в виде бляшек на расстоянии 1 см от нее и 2–2,5 см друг от друга. Инкубацию проводят в течение 48 ч при температуре плюс $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ в анаэроаэратах при 10–25 % CO_2 . Параллельно делают высеv культур на чашки с агаром Хоттингера, которые инкубируют при температуре плюс $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ в обычной воздушной атмосфере в течение 24 ч.

По истечении этого срока учитывают капсулообразование. Вирулентные культуры сибиреязвенного микроба вырастают в виде крупных слизистых колоний в SM-форме, а капсульные варианты или апатогенные вырастают в R-форме. Затем чашки переносят в холодильник и выдерживают в условиях холодильника 48–72 ч. Для обнаружения токсинообразования чашки просматривают при естественном освещении на черном фоне, пользуясь листом черной бумаги. При наличии у культуры способности образовывать токсин на месте встречи антигена и антител формируется белый преципитат, располагающийся в виде 1–3 линий (приложение 10 к настоящим МУ). Непродуцирующие токсин колонии лишены таких линий. Результаты вирулентности культур *B. anthracis in vitro* интерпретируют также, как и при использовании среды «СОПЭК».

8.18. Вирулентность выделенных культур *in vivo* определяют двумя методами: вычислением абсолютной летальной дозы (лат. *Dosis certa letalis*, далее – DCL) или расчетной инфицирующей дозы, вызывающей гибель 50 % животных (лат. *Letalis dosis*, далее – LD₅₀). Для заражения животных используют спорую взвесь, которую готовят следующим образом. Сибиреязвенную культуру отсевают на специальные питательные среды для образования спор (приложение 6 к настоящим МУ): среда Гладстона-Филдса или голодный LB-агар и инкубируют в течение 5 – 7 суток при температуре плюс (36 ± 1) °С. Споры *B. anthracis* можно получить также высевом на агар Хоттингера (pH 7,2), содержащий 60 % аминного азота в течение 4 суток при температуре плюс (36 ± 1) °С. Процесс спорообразования контролируют просмотром мазков, окрашенных по Ребигеру. При наличии 95 – 100 % спор культуру смывают дистиллированной водой и суспензию помещают на 5 – 7 суток в холодильник для лизиса оставшихся вегетативных палочек. Качество спор определяют в мазке, окрашенном по Цилю-Нильсену (см. п. 7.13). При просмотре мазка в десяти полях зрения подсчитывают количество розовых (нормальных) спор, отдельно красных, синих спор и палочек. После подсчета находят процентное содержание спор, которое в стандартной споровой суспензии должно быть:

- 90 – 98 % типичных спор (розовой окраски с более интенсивной окраской по периферии, правильной вытянутой формы с закругленными концами);
- 3 – 5 % спор округлой формы темно-синего цвета;
- 2 – 3 % прокрашенных (темно-красного цвета) спор;
- 1 – 2 % остатков вегетативных клеток.

При высеве на агаровые среды определяют количество живых спор, а общую концентрацию спор определяют счетом в камере Горяева.

Для определения концентрации жизнеспособных спор готовят десятикратные разведения полученной взвеси с использованием в качестве разводящей жидкости 0,05 – 0,1 % раствора Твина-80 на дистиллированной воде (приложение 6 к настоящим МУ) и делают высеv в объеме 0,1 мл из пробирок с разведениями 10⁻⁶ и 10⁻⁷ на 3 чашки (каждое разведение) с агаром Хоттингера. Посевы инкубируют при температуре плюс (36 ± 1) °С в течение 18 – 20 ч. На следующий день подсчитывают выросшие колонии и вычисляют концентрацию спор в исходной взвеси, затем готовят для заражения соответствующие разведения в 0,9 % растворе хлорида натрия.

Для определения LD₅₀ чаще всего используют белых беспородных мышей весом 18 – 20 г. Споровые взвеси, содержащие 1, 10, 100, 1000 и 10000 спор, вводят подкожно в объеме 0,5 мл, используя 4 – 6 животных на каждую дозу. За зараженными животными наблюдают в течение 10 суток, отмечают в каждой группе павших от сибиреязвенной инфекции животных. Статистическую обработку полученных результатов проводят по методу Рида и Менча или Кербера в модификации Ашмарина И.П. и Воробьева А.А., в соответствии с документами по стандартизации⁵⁹ возможно использование формул электронных таблиц MS Excel.

⁵⁹ ГОСТ Р ИСО 5725-2-2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений», введенный постановлением Госстандарта России от 32.04.2002 № 161-ст.

Для определения DCL используют морских свинок, кроликов и три заражающие дозы – 100, 1000 и 10000 спор. Каждой дозой инфицируют не менее трех животных. Наблюдение за ними проводят до 10 суток. Из органов павших животных делают мазки-отпечатки для бактериоскопии и посева на соответствующие питательные среды для установления специфичности гибели животных.

Культуры возбудителя сибирской язвы считаются вирулентными, если значения LD₅₀ для белых мышей или DCL для морских свинок и кроликов не превышают 10000 спор.

8.19. При идентификации штаммов сибиреязвенного микроба с атипичным капсулообразованием из всех выросших фосфатазонегативных колоний, как шероховатых (I, III типы), так и гладких, слизистых (II тип) (приложение 8 к настоящим МУ), делают мазки и окрашивают их по Ребигеру или иммуноглобулинами диагностическими флуоресцирующими сибиреязвенными вегетативными адсорбированными.

Для дальнейшего исследования отбирают колонии, в мазках из которых выявляются палочки, расположенные длинными цепочками с типичной морфологией. Палочки из колоний II типа могут быть окружены капсулой, окрашенной в розовый цвет при окраске по Ребигеру, или люминесцируют на 3+, 4+ при окраске иммуноглобулинами диагностическими флуоресцирующими сибиреязвенными вегетативными. Из отобранных колоний делают пересевы в пробирки с МПБ или LB-бульоном и на чашки с 1% бикарбонатно-сывороточным агаром. Последние выращивают при 5–50% CO₂ (см. п. 8.8). Результаты учитывают через 24 ч инкубации при температуре плюс (36 ± 1) °С. В бульоне отмечают придонный рост в виде «комочка ваты» с сохранением прозрачности над ним, характерный для штаммов I и III типа. Штаммы II типа вызывают диффузное помутнение среды. На 1% бикарбонатно-сывороточном агаре штаммы I и II типа растут в SM-форме в виде крупных слизистых колоний. Из колоний делают мазки с последующей их окраской на наличие капсулы. В мазках обнаруживают палочки, окруженные капсулой. Штаммы III типа растут на этой среде в R-форме, капсула в мазках не обнаруживается.

Из культур на 1% бикарбонатно-сывороточном агаре готовят взвесь микробов в 0,9% растворе натрия хлорида, суспендируя одну колонию в 1 мл, которой заражают белых мышей подкожно в объеме 0,5 мл во внутреннюю поверхность бедра. Павших мышей вскрывают, отмечают характерную патологоанатомическую картину, делают мазки-отпечатки и высевы из органов и места введения. Выживших мышей забивают на десятые сутки и исследуют аналогично. В мазках-отпечатках от мышей, павших после заражения штаммами I и II типа, обнаруживаются капсульные клетки сибиреязвенного микроба и обильный рост микроба на питательных средах из всех органов и мест введения. В мазках от мышей, зараженных штаммами III типа, клетки микроба в мазках наблюдаются редко, в основном из места введения, и они лишены капсулы, а из органов и мест введения вырастают единичные колонии в R-форме. В месте введения культур штаммов сибиреязвенного микроба I и III типов на 2–3 сутки развивается специфический студенистый геморрагический отек подкожной клетчатки, формирующийся под действием отечной фракции сибиреязвенного

экзотоксина (приложение 8 к настоящим МУ). Дальнейшая идентификация выделенных культур атипичных штаммов проводится с использованием методов, описанных выше.

IX. Молекулярный анализ штаммов *B. anthracis*

9.1. Молекулярный анализ выделенных штаммов *B. anthracis*, включающий проведение молекулярно-генетических и масс-спектрометрических исследований, относится к дополнительным методам и осуществляется в Центрах индикации, в Референс-центре по мониторингу за возбудителем сибирской язвы, Центрах верификации, научно-исследовательских учреждениях заинтересованных ведомств⁶⁰.

Алгоритм проведения молекулярно-генетического анализа штаммов *B. anthracis*

9.2. Для молекулярно-генетического исследования штаммов *B. anthracis* применяется алгоритм последовательного генетического анализа методами с возрастающей разрешающей способностью.

1 этап – определение принадлежности штамма к одной из групп канонических SNP с использованием основной системы canSNP-генотипирования, а также дополненных. Метод анализа canSNP характеризуется низкой разрешающей способностью, но в силу высокой эволюционной стабильности canSNP позволяет определить в общих чертах положение штамма в глобальной популяции *B. anthracis*.

Для проведения исследований используют один из следующих методов: ПЦР с учетом результатов в режиме «реального времени» с высокоспецифичными аллель-дискриминирующими зондами LNA- или MGB-типа, ПЦР-амплификация с анализом температур плавления ампликонов высокого разрешения (англ. High Resolution Melting Curve Analysis (далее – HRM), технология SnapShot (Applied Biosystems), *in silico* по результатам NGS.

2 этап – определение принадлежности штамма к одному из MLVA-генотипов, основанное на определении размеров аллелей нескольких VNTR-локусов, сочетание которых определяет MLVA-генотип. MLVA-типирование характеризуется высокой разрешающей способностью, обусловленной высокой скоростью мутаций VNTR-областей генома и большим числом возможных аллельных вариантов. Используется для установления источника инфекции и определения идентичности изолятов при эпидемиологическом расследовании вспышек сибирской язвы.

MLVA-типирование возможно проводить с использованием нескольких систем:

– MLVA15: определение числа tandemных повторов в 15 VNTR-локусах: *virrA*, *virrB1*, *virrB2*, *virrC1*, *virrC2*, CG3, pXO1aat, pXO2at, VNTR 12, 16, 17, 19, 23, 32 (идентичен локусу Vams 1), 35;

⁶⁰ Приказ Роспотребнадзора от 01.12.2017 № 1116.

– MLVA25: *vrnA*, *vrnB1*, *vrnB2*, *vrnC1*, *vrnC2*, CG3, pXO1aat, pXO2at, Vams 1, 3, 5, 13, 15, 21, 22, 23, 24, 25, 28, 30, 31, 34, 44, 51, 53;

– MLVA31: *vrnA*, *vrnB1*, *vrnB2*, *vrnC1*, *vrnC2*, CG3, pXO1aat, pXO2at, Vams 1, 3, 5, 13, 15, 21, 22, 23, 24, 25, 28, 30, 31, 34, 44, 51, 53, VNTR 12, 16, 17, 19, 23, 35.

Проводится серия моно- или мультиплексных ПЦР с праймерами к 15, 25 или 31 VNTR-локусам с определением размеров ампликонов методом гель-электрофореза и секвенированием ампликонов по Сэнгеру. В связи с тем, что дискриминирующие возможности схем MLVA15, 25 и 31 находятся примерно на одном уровне, то в большинстве случаев можно ограничиться генотипированием по схеме MLVA15 как менее трудоемкой и более информативной в связи с наличием данных о MLVA15-генотипах значительного количества штаммов *B. anthracis*, представленных в соответствующей панели базы данных MLVAbank for Microbes Genotyping Databases, с которой сравнивают MLVA-генотипы исследуемых штаммов.

Для первичного MLVA-типирования культур может быть использована система MLVA7: *vrnA*, Vams 3, 5, 22, 34, 44, VNTR 23. Анализ ампликонов может быть проведен в формате агарозного гель-электрофореза.

Филогенетический анализ на основе MLVA позволяет оценить достаточно точно положение штаммов в популяции и предположить общего предшественника в клоновом кластере.

3 этап – проведение NGS и анализ полученных данных, позволяющий получить представление о генетических взаимоотношениях штаммов и их месте в глобальной популяции *B. anthracis*.

3.1 – анализ SNP корового генома *B. anthracis* на основе полногеномного секвенирования. Для анализа достаточно черновой сборки полного генома на уровне контигов или скаффолда. Филогенетический анализ геномов исследуемого штамма и депонированных в GenBank⁶¹ штаммов дает наиболее точное представление о положении штамма в глобальной популяции *B. anthracis*, ближайших родственных штаммах, а также полную информацию о геноме штамма. Для проведения филогенетического анализа используют биоинформационный алгоритм с применением комплекса программ, включающий получение SNP-профилей в результате выравнивания генома каждого из исследуемых штаммов на референс-геном, а также на геномы других штаммов *B. anthracis*, взятых в выборку для сравнения. По полученному набору SNP-профилей проводится филогенетический анализ и визуализация результата в виде дендрограмм. Разрешающая способность максимальная, позволяющая различать изоляты из одной вспышки при наличии отличий в одном SNP. Полученная информация может быть использована для проведения эволюционного анализа.

3.2 – анализ структурных и регуляторных генов факторов патогенности (MVLST) полногеномных последовательностей. MVLST ввиду высокой дискриминирующей способности позволяет дифференцировать штаммы на основе детерминант патогенности. Такой анализ *in silico* выполним на уровне

⁶¹ База данных, содержащая аннотированные последовательности ДНК, РНК и белков (GenBank): ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/?taxon=1392 (в свободном доступе).

черновой сборки, при условии, что анализируемый локус расположен в одном контиге.

MVLST-типирование может быть также проведено при постановке фрагментарного секвенирования по Сэнгеру с праймерами к переменным областям генов вирулентности.

3.3 – анализ единичных нуклеотидных повторов (SNR-типирование) по данным полногеномного секвенирования также позволяет выявить отличия между штаммами, изолированными в процессе одной вспышки. Анализ доступен при расположении изучаемых локусов в одном контиге. Метод SNR-типирования характеризуется очень высокой разрешающей способностью в связи с крайне высокой скоростью мутирования SNR-локусов.

SNR-типирование также может быть проведено при постановке ПЦР с четырьмя парами праймеров, один из которых в каждой паре имеет флуоресцентную метку, что позволяет определять размеры ампликонов капиллярным электрофорезом или секвенированием по Сэнгеру.

3.4 – анализ областей генома с делециями/вставками (INDEL-типирование) по данным полногеномного секвенирования.

INDEL-типирование может быть также проведено при постановке ПЦР с праймерами к INDEL-локусам с детекцией результатов в формате гель-электрофореза с маркерами молекулярных размеров.

9.3. Подготовку штаммов к ПЦР проводят в соответствии с п. 6.16. Для проведения NGS подготовку штаммов и экстракцию геномной ДНК проводят в соответствии с инструкциями производителей к соответствующим наборам реагентов.

9.4. Для проведения молекулярно-генетических исследований штаммов используют препараты и реагенты, зарегистрированные и разрешенные к применению на территории Российской Федерации в установленном порядке⁶².

Идентификация штаммов *B. anthracis* методом времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией (ионизацией)

9.5. В качестве дополнительного метода идентификации выделенных штаммов *B. anthracis* также используется времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией (ионизацией) (далее – MALDI-TOF MS).

Пробоподготовку культур возбудителя сибирской язвы осуществляют в соответствии с методическими документами⁶³. Для исследования методом

⁶² Часть 4 статьи 38 Федерального закона от 21.11.2011 № 323-ФЗ; постановление Правительства Российской Федерации от 30.11.2024 № 1684.

⁶³ МУК 4.2.3733-21 «Подготовка культур микроорганизмов I – II групп патогенности для анализа методом MALDI-TOF масс-спектрометрии и формирование баз данных референсных масс-спектров для автоматической идентификации микроорганизмов», утвержденные руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 28.12.2021.

MALDI-TOF MS используют 18–24 ч чистые вегетативные культуры *B. anthracis*, выращенные из отдельной колонии на пластинках LB-агара при температуре плюс $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$. Для исследования спор *B. anthracis* используют взвеси спор, отмытые в дистиллированной воде, полученные после 5–7 суток культивирования на среде Гладстона-Филдса.

Обеззараживание и белковая экстракция. В полипропиленовую пробирку объемом 1,5–2,0 мл вносят 300 мкл деионизованной воды, в которой суспендируют типичную колонию *B. anthracis*, выращенную на LB-агаре. Для исследования спор готовят взвесь в соответствии с со стандартным образцом мутности бактериальных взвесей ОСО 42-28-85 (10 МЕ). Отбирают 20 мкл полученной суспензии вегетативных клеток или споровой взвеси и переносят в 80 мкл трифторуксусной кислоты в полипропиленовые пробирки объемом 1,5–2,0 мл с завинчивающимися крышками, перемешивают на вортексе, выдерживают при комнатной температуре в течение 10 мин, затем центрифугируют в течение 20 мин при 13000 об/мин. Полученный супернатант, не задевая осадка, переносят в ультрамикроцентрифужный PVDF-фильтр с диаметром пор 0,1–0,22 мкм, центрифугируют при 13000 об/мин в течение 20 мин. Фильтрат из нижней части центрифужного ультрафильтра переносят в полипропиленовую пробирку.

Верхнюю и нижнюю составляющие части центрифужного ультрафильтра помещают в 6 % раствор перекиси водорода с 0,5 % раствором моющего средства с последующим автоклавированием в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями⁶⁴. Полученный объем фильтрата доводят деионизованной водой до 200 мкл, добавляют 200 мкл ацетонитрила, перемешивают на вортексе и центрифугируют в течение 20 с при 13000 об/мин, чтобы убрать капли образца со стенок и крышки пробирки. Полученная суспензия готова для нанесения на ячейки мишени.

Для проведения анализа белковых экстрактов методом MALDI-TOF MS обеззараженный образец объемом 1 мкл помещают на пластину-мишень из нержавеющей стали и высушивают на воздухе. Затем на высушенный образец наносят 1 мкл матрицы, состоящей из α -циано-4-гидроксикоричной кислоты в растворе, содержащем 500 мкл ацетонитрила, 475 мкл ультрачистой воды и 25 мкл трифторуксусной кислоты, и подсушивают на воздухе. Далее проводят исследование белковых экстрактов штаммов методом MALDI-TOF MS в соответствии с рекомендациями производителя масс-спектрометра с последующим биоинформационным анализом полученных результатов и их сравнением с доступными и собственными базами масс-спектров *B. anthracis*.

Х. Выдача заключений по результатам лабораторного исследования на сибирскую язву

10.1. После проведения соответствующих этапов лабораторного исследования на сибирскую язву в определенные сроки можно давать заключения о предварительных и окончательных результатах. В расчетные сроки не включено время, необходимое для подготовки проб (разбор проб и предварительная

⁶⁴ Таблица 7 приложения 2 СанПиН 3.3686-21.

очистка, фильтрование, разведение или концентрирование материала, разделение на аликвоты).

10.2. Предварительный ответ выдается по результатам каждого из использованных для специфической индикации методов:

1) при исследовании патологического материала от людей и животных:

– через 2 – 6 ч, по результатам световой микроскопии и МФА с иммуноглобулинами диагностическими флуоресцирующими сибирезвенными вегетативными адсорбированными;

– через 3 – 4 ч, по результатам нМФА и аллерготеста *in vitro*;

– через 2 – 6 ч, по результатам РНГА;

– через 8 – 12 ч, по результатам ПЦР;

– через 2 – 6 ч (горячий способ) и 20 – 24 ч (холодный способ), по результатам реакции преципитации по Асколи;

2) при исследовании секционного материала от трупов людей и животных, а также кожи, шкур, шерсти, мяса и мясопродуктов:

– через 2 – 6 ч (горячий способ) и 20 – 24 ч (холодный способ), по результатам реакции преципитации по Асколи;

– через 2 – 6 ч, по результатам МФА с иммуноглобулинами диагностическими флуоресцирующими сибирезвенными спорowymi или вегетативными адсорбированными;

– через 8 – 12 ч, по результатам ПЦР;

3) при исследовании материала из ООС:

– через 8 – 12 ч, по результатам ПЦР.

10.3. Окончательные результаты специфической индикации, ускоренной идентификации выдаются при исследовании любого материала, подозрительного на зараженность возбудителем сибирской язвы, через 48 ч на основании:

– результатов ПЦР с материалом из типичных колоний;

– результатов МФА при окраске мазков из колоний иммуноглобулинами диагностическими флуоресцирующими сибирезвенными вегетативными адсорбированными.

10.4. Окончательные результаты полного лабораторного анализа выдаются при исследовании любого материала, подозрительного на зараженность возбудителем сибирской язвы, через 2 – 10 суток на основании:

– морфологии колоний на плотных питательных средах, в том числе и дифференциально-диагностических, и характера роста в жидких питательных средах;

– морфологии микробных клеток в мазках из выросших подозрительных колоний на плотных и жидких питательных средах;

– патологоанатомической картины у забитых на 2 – 3 сутки или павших биопробных животных, обнаружения капсулы в мазках-отпечатках из органов этих животных и морфологии колоний при посеве органов на питательном агаре;

– характера роста колоний на 1 % бикарбонатно-сывороточном агаре и морфологии клеток в мазках, приготовленных из колоний;

– результатов теста с сибирезвенным бактериофагом;

– результатов теста на щелочную фосфатазу;

– результатов теста на гемолиз на агаре с дефибринированной кровью;

- результатов теста на чувствительность к пенициллину;
- результатов теста на подвижность;
- результатов теста на лецитиназу.

Временной график лабораторных исследований на сибирскую язву приведен в приложении 11 к настоящим МУ.

10.5. Диагноз сибирской язвы у человека считают лабораторно подтвержденным в случаях⁶⁵:

- выделения из материала больного, секционного материала умершего культуры *B. anthracis*, гибели не менее одного зараженного лабораторного животного и выделения из его органов возбудителя сибирской язвы;

- и (или) выделения вирулентной культуры *B. anthracis* из предполагаемого источника или фактора передачи инфекции;

- и (или) выявления ДНК возбудителя сибирской язвы (положительного результата ПЦР) в пробах биологического материала при наличии клинической картины одной из форм заболевания и характерного эпидемиологического анамнеза.

Если в процессе исследований положительные результаты не получены, окончательное отрицательное заключение выдается не ранее 10 суток после получения отрицательных результатов исследования материала от зараженных биопробных животных.

10.6. Диагноз сибирской язвы у животных считают установленным в случаях:

- выделения из биологического или патологического материала больного или павшего животного культуры *B. anthracis*;

- и (или) выявления ДНК возбудителя сибирской язвы (положительного результата ПЦР) в биологическом или патологическом материале больного или павшего животного;

- и (или) выявления антигена возбудителя сибирской язвы⁶⁶.

10.7. Хранение рабочих коллекций штаммов возбудителя сибирской язвы осуществляется в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями⁶⁷.

Штаммы *B. anthracis* хранятся в споровой форме. Споры для хранения подготавливают в соответствии с п. 8.18. При наличии 95 – 100 % спор культуру смывают дистиллированной водой и отстаивают в условиях холодильника в течение 2 – 3 суток для лизиса оставшихся вегетативных клеток. Затем надсадочную жидкость с помощью пипетки осторожно удаляют, а споры заливают 30 – 50 % химически чистым глицерином, хранят в запаянных ампулах или в полипропиленовых пробирках с завинчивающимися крышками, герметично обработанными парафином. Споры штаммов возбудителя сибирской язвы также могут храниться в лиофилизированном состоянии в запаянных ампулах. Подготовленные споры длительно сохраняют свои биологические свойства, не

⁶⁵ Пункт 1027 СанПиН 3.3686-21.

⁶⁶ Пункт 21 ветеринарных правил осуществления профилактических, диагностических, лечебных, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов сибирской язвы.

⁶⁷ Пункты 493 – 506 СанПиН 3.3686-21.

изменяя исходную концентрацию, в условиях холодильника при температуре плюс 2 – 8 °С в течение многих лет.

XI. Профилактика сибирской язвы

11.1. Санитарно-противоэпидемические (профилактические) мероприятия в отношении сибирской язвы включают комплекс санитарных, ветеринарных, организационно-управленческих мер, направленных на предупреждение возникновения и распространения сибирской язвы, в соответствии с законодательством Российской Федерации⁶⁸.

Санитарно-противоэпидемические (профилактические) мероприятия в отношении сибирской язвы подлежат включению в региональные программы (комплексные планы) по профилактике инфекционных болезней⁶⁹.

Специфическая профилактика сибирской язвы

11.2. Специфическая профилактика сибирской язвы заключается в проведении вакцинации и ревакцинации против сибирской язвы людей и животных. Вакцинацию в плановом порядке рекомендуется проводить ежегодно в первом квартале года.

11.3. Специфическая иммунизация людей против сибирской язвы осуществляется в соответствии с законодательством Российской Федерации⁷⁰, календарем профилактических прививок по эпидемическим показаниям⁷¹, санитарно-эпидемиологическими требованиями⁷², инструкциями по применению вакцин.

Органы, уполномоченные осуществлять федеральный государственный санитарно-эпидемиологический контроль (надзор), осуществляют⁷³:

– принятие решения об определении контингентов риска, подлежащих специфической иммунизации, о проведении и объеме профилактической вакцинации людей против сибирской язвы с учетом эпизоотологической и эпидемиологической ситуации;

– согласование плана проведения иммунизации населения, разрабатываемого органами исполнительной власти в субъектах Российской Федерации в области охраны здоровья;

⁶⁸ Статья 29 Федерального закона от 30.03.1999 № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения»; статья 2.2 Закона Российской Федерации от 14.05.1993 № 4979-1 «О ветеринарии».

⁶⁹ Пункты 9, 1095 СанПиН 3.3686-21.

⁷⁰ Статья 10 Федерального закона от 17.09.1998 № 157-ФЗ «Об иммунопрофилактике инфекционных болезней».

⁷¹ Приказ Минздрава России от 06.12.2021 № 1122н «Об утверждении национального календаря профилактических прививок, календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям и порядка проведения профилактических прививок» (зарегистрирован Минюстом России 20.12.2021, регистрационный № 66435), с изменениями, внесенными приказом Минздрава России от 12.12.2023 № 677н (зарегистрирован Минюстом России 30.01.2024, регистрационный № 77040).

⁷² Пункты 65 – 73, 1097 – 1102 СанПиН 3.3686-21.

⁷³ Пункты 1099 – 1102 СанПиН 3.3686-21.

- контроль проведения вакцинации;
- контроль транспортировки и хранения иммунобиологических препаратов.

Ответственными за организацию и проведение вакцинации населения против сибирской язвы являются органы исполнительной власти в субъектах Российской Федерации в области охраны здоровья⁷⁴.

11.4. Специфическая иммунизация животных против сибирской язвы осуществляется в соответствии с ветеринарными правилами⁷⁵, а также инструкциями по применению вакцин.

Неспецифическая профилактика сибирской язвы

11.5. Неспецифическая профилактика сибирской язвы представляет комплекс мероприятий, организуемых территориальными органами Роспотребнадзора и осуществляемых при участии учреждений, подведомственных Роспотребнадзору, совместно с организациями ветеринарной службы, органами исполнительной власти субъектов Российской Федерации в сфере охраны здоровья, органами местного самоуправления муниципальных образований, и включает в себя:

- определение балансодержателей СЯЗ, содержание в надлежащем ветеринарно-санитарном состоянии, недопущение использования для хозяйственных целей почв в границах захоронений и прилежащих территорий, установление СЗЗ СЯЗ, недопущение снятия с учета и ликвидации СЯЗ;
- обеззараживание почвы СЯЗ в местах с достоверно установленными границами;
- оборудование достаточного количества убойных пунктов;
- поголовный учет восприимчивых видов животных с целью включения в план проведения профилактической вакцинации;
- пресечение реализации продукции животноводства без ветеринарной экспертизы в местах несанкционированной торговли;
- соблюдение правил биологической безопасности при работе с животными, при сборе, хранении, транспортировке, обработке, переработке продуктов и сырья животного происхождения (например, использование спецодежды, средств индивидуальной защиты);
- проведение профилактических дезинфекционных, дезинсекционных, дератизационных мероприятий, например, в животноводческих хозяйствах, пунктах уоя скота, на предприятиях по переработке продуктов, сырья животноводства;
- подготовка медицинских и ветеринарных специалистов по вопросам эпидемиологии, клиники, диагностики, лечения, профилактики сибирской язвы, формирование настороженности специалистов в отношении данной инфекции;
- проведение информационно-разъяснительной работы с населением с использованием средств массовой информации о факторах риска заражения и

⁷⁴ Пункт 1101 СанПиН 3.3686-21.

⁷⁵ Глава III Ветеринарных правил осуществления профилактических, диагностических, лечебных, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов сибирской язвы.

опасности сибирской язвы, о недопустимости сокрытия фактического числа восприимчивых животных в хозяйстве, препятствия проведению вакцинации скота, необходимости своевременного информирования госветслужбы о каждом случае заболевания или гибели животного, недопустимости проведения вынужденного убоя больных животных без осмотра ветеринарными специалистами, реализации полученного сырья и продуктов животноводства, приобретения сельскохозяйственных животных без ветеринарных сопроводительных документов, сырья и продукции животноводства без ветеринарной экспертизы в местах несанкционированной торговли, о мерах наказания за нарушение законодательства в области ветеринарии и обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения;

– формирование плана проведения профилактических мероприятий с учетом результатов ранжирования территорий субъектов Российской Федерации по степени потенциального риска осложнения эпизоотолого-эпидемиологической ситуации по сибирской язве.

Экстренная профилактика сибирской язвы

11.6. Лицам, подвергшимся риску заражения сибирской язвой, проводится экстренная профилактика (превентивное лечение). Экстренную профилактику следует проводить в максимально ранние сроки после возможного инфицирования. Превентивное лечение не назначается лицам, у которых с момента последнего контакта с больным (павшим) животным, контактом с сырьем, продукцией животноводства, употребления в пищу продукции от больного сибирской язвой животного прошло более восьми суток. Лицам, находящимся в очаге сибирской язвы, экстренная профилактика назначается на весь период пребывания в очаге⁷⁶.

11.7. С целью экстренной профилактики лиц, подвергшихся воздействию возбудителя сибирской язвы, применяют те же антибактериальные препараты, что и для лечения инфекции (например, фторхинолоны, тетрациклины, пенициллины, рифампицин), но в течение более короткого периода – пять дней.

11.8. При экстренной профилактике сибирской язвы у лиц, подвергшихся ингаляционному воздействию спор *B. anthracis* (в том числе при биотеррористических актах), продолжительность курса антибиотикопрофилактики составляет до 60 дней, что обусловлено возможностью позднего прорастания спор *B. anthracis* в альвеолах с развитием инфекционного процесса спустя длительное время.

11.9. Через двое суток после окончания курса экстренной антибиотикопрофилактики при необходимости проводят вакцинацию (или ревакцинацию при давности вакцинации свыше восьми месяцев) живой сибиреязвенной вакциной.

11.10. С целью экстренной профилактики возможно применение противосибиреязвенного иммуноглобулина в соответствии с инструкцией производителя, а также иммуномодуляторов.

⁷⁶ Пункт 1076 СанПиН 3.3686-21.

**Направление
на исследование биологического материала
(заполняется на каждый образец отдельно)**

Сведения об организации-получателе проб	
Наименование	
ИНН	
Юридический адрес	
Фактический адрес	
Подразделение организации (при наличии)	
Контактное лицо (ФИО, должность, телефон)	
Сведения об организации-отправителе проб	
Наименование	
ИНН	
Юридический адрес	
Фактический адрес	
Контактное лицо (ФИО, должность, телефон)	
Основание проведения исследования и формат направления результатов	
Цель исследования	
Основание (наименование и реквизиты документа основания)	
Сведения о заказчике (из документа основания):	
наименование	
ИНН	
юридический адрес	
фактический адрес	
Формат направления результатов исследования	
Сведения о больном (умершем)	
ФИО	
Дата рождения	
Возраст	
Пол	
Социальный статус	
Социально-профессиональная группа	
Принадлежность к декретированным группам	
Место работы	
Адрес места жительства	
Дата заболевания	
Дата обращения за медицинской помощью	
Дата госпитализации	
Диагноз предварительный	
Особенности эпидемиологического анамнеза	
Информация о проведении антибактериальной терапии (даты проведения, использованные препараты с указанием дозировки)	
Сведения об образце	
Идентификатор пробы (при наличии)	
Вид биологического материала	

Примерный вес (объем), с указанием ед. измерения	
Наименование показателей и методов исследования	
НД на метод отбора	
Дата отбора	
Время отбора	
Место отбора:	
наименование	
ИНН	
юридический адрес	
фактический адрес	
ФИО, должность и место работы специалиста, отобравшего пробу	
ФИО, должность и место работы специалистов, присутствовавших при отборе проб	
Упаковка	
Условия доставки	
Дата доставки	
Время доставки	
Лицо, доставившее пробу:	
наименование организации	
должность	
ФИО	
Лицо, принявшее пробу	
наименование организации	
должность	
ФИО	

**Направление
на исследование продовольственного сырья и продуктов животного
происхождения, материала из объектов окружающей среды
(заполняется на каждый образец отдельно)**

Сведения об организации-получателе проб	
Наименование	
ИНН	
Юридический адрес	
Фактический адрес	
Подразделение организации (при наличии)	
Контактное лицо (ФИО, должность, телефон)	
Сведения об организации-отправителе проб	
Наименование	
ИНН	
Юридический адрес	
Фактический адрес	
Контактное лицо (ФИО, должность, телефон)	
Основание проведения исследования и формат направления результатов	
Цель исследования	
Основание (наименование и реквизиты документа основания)	
Сведения о заказчике (из документа основания):	
наименование	
ИНН	
юридический адрес	
фактический адрес	
Наименование показателей и методов исследования	
Формат направления результатов исследования	
Сведения об образце	
Объект исследования	
Вес (объем), с указанием ед.измерения	
Дата отбора	
Время отбора	
Место отбора:	
наименование	
адрес	
Упаковка	
Условия доставки	
Дата и время доставки	
Лицо, доставившее пробу:	
наименование организации	
должность	
ФИО	
Лицо, принявшее пробу:	
наименование организации	
должность	
ФИО	

**Диагностические препараты, применяемые для индикации и идентификации
возбудителя сибирской язвы**

№	Наименование препарата	Регистрационное удостоверение
1	Набор реагентов для выявления ДНК <i>Bacillus anthracis</i> в биологическом материале и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени»	ФСР 2008/02417
2	Набор реагентов для выявления и идентификации ДНК возбудителя сибирской язвы методом полимеразной цепной реакции в реальном времени «ОМ-Скрин-Сибирская язва-РВ»	РЗН 2015/2992
3	Набор реагентов для генетического типирования штаммов возбудителя сибирской язвы методом фрагментного анализа (ОМ-сибирская язва-Генотип)	РЗН 2016/3950
4	Тест-система для выявления ДНК <i>Bacillus anthracis</i> рХО1+ методом полимеразной цепной реакции «ГенСиб»	ФСР 2007/00101
5	Набор реагентов для выявления ДНК возбудителей чумы, сибирской язвы и туляремии методом ПЦР в режиме «реального времени» (MULTI-FLU)	РЗН 2013/1359
6	Иммунохроматографическая тест-система для экспресс-выявления и идентификации спор возбудителя сибирской язвы <i>B. anthracis</i> «ИХ тест-система <i>B. anthracis</i> »	ФСР 2009/05485
7	Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие сибиреязвенные споровые адсорбированные сухие	ФСР 2011/11339
8	Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие сибиреязвенные вегетативные адсорбированные сухие	ФСР 2011/11338
9	Набор реагентов «Диагностикум эритроцитарный сибиреязвенный антигенный сухой»	ФСР 2012/13064
10	Набор реагентов для бактериологических исследований «Питательная среда для выделения возбудителя сибирской язвы сухая»	ФСР 2011/10648
11	Основа агара PLET (PLET Agar Base) с селективной добавкой для выделения <i>B. anthracis</i> (Anthraxis Selective Supplement)	ФСЗ 2009/03709, ФСЗ 2012/12473

№	Наименование препарата	Регистрационное удостоверение
12	LB-агар, LB-бульон	ФСЗ 2009/04467 РЗН 2013/994 ФСЗ 2009/03707 ФСЗ 2011/11139 ФСЗ 2012/11572
13	Бактериофаг диагностический сибиреязвенный Гамма А-26 жидкий	ФСР 2011/10451
14	Диагностический фаг-тест-набор для идентификации сибиреязвенного возбудителя	РЗН 2009/05474
15	Набор реагентов для определения спор <i>Bacillus anthracis</i> в реакции латекс-агглютинации	ФСР 2011/12159
16	Сыворотка лошадиная нормальная для культивирования микроорганизмов жидкая	ФСР 2008/03463
17	Глобулин противосибиреязвенный из сыворотки крови лошади	СТО 00482944-0002-2014
18	Диски индикаторные с противомикробными лекарственными средствами	ФСР 2009/06472
19	ПРЕЦИПАНТР® Набор компонентов для диагностики сибирской язвы в реакции преципитации	СТО 00482944-0012-2014
20	Набор реагентов «Тест-система для обнаружения антител к возбудителю сибирской язвы непрямым методом флуоресцирующих антител»	-
21	Магноиммуносорбенты для селективного концентрирования спор сибиреязвенного микроба	-

Примечание: для индикации и идентификации возбудителя сибирской язвы могут применяться диагностические препараты с аналогичными или лучшими характеристиками.

Референс-центр по мониторингу за возбудителем сибирской язвы и Центры верификации для диагностических целей, идентификации и проведения исследований штаммов *B. anthracis* могут использовать экспериментальные препараты и тест-системы⁷⁷.

⁷⁷ Части 4, 11.1 статьи 38 Федерального закона от 21.11.2011 № 323-ФЗ.

Контроль питательных сред по биологическим показателям для выделения и культивирования возбудителя сибирской язвы

4.1. Диагностические среды включают: среды накопительные и для культивирования, выделения возбудителя (элективные и селективные); дифференциальные (например, содержащие индикаторы, красители), для идентификации, позволяющие по отдельным признакам проводить идентификацию микроорганизмов.

4.2. Биологические показатели, применяемые для оценки питательных сред. Чувствительность для диагностических и дифференциальных сред определяется по максимальному разведению культуры, при котором на всех засеянных объектах (чашках, пробирках) наблюдается рост.

Показатель прорастания для питательных сред определяется по проценту выросших колоний микроорганизма от числа засеянных клеток. По этому показателю оценивают питательные среды для культивирования.

Эффективность питательных сред для производства медицинских иммунобиологических препаратов определяется по выходу микробных клеток с 1 мл питательной среды.

Показатель стабильности основных свойств микроорганизмов при выращивании на испытываемой среде определяется по отношению числа атипичных по морфологии, биохимическим, серологическим, фаголизабельным и другим свойствам колоний к числу выросших на агаровых пластинках колоний тест-штаммов.

Дифференцирующие свойства для сред идентификации и дифференциации определяются по выраженности отличительных видовых и других признаков микроорганизмов.

Показатель ингибиции селективных сред выделения определяется по степени подавляющего воздействия на постороннюю микрофлору и выражается количеством микробов-ассоциантов, которое не растет на среде, или числом сформировавшихся колоний микробов-ассоциантов, не препятствующим выделению возбудителя.

Показатель скорости роста на диагностических средах определяется по минимальному времени выростания культуры.

4.3. Организация проведения контроля. При лабораторной диагностике сибирской язвы и идентификации сибирезвенного микроба используют питательные среды зарегистрированные⁷⁸ и не зарегистрированные, но разрешенные к применению в установленном порядке⁷⁹.

Для зарегистрированных питательных сред бактериологическому контролю подлежит первая варка и по одной варке ежегодно от каждой серии, а также все варки серии при изменении условий ее хранения или приготовления.

Для незарегистрированных питательных сред, приготовленных по

⁷⁸ Часть 4 статьи 38 Федерального закона от 21.11.2011 № 323-ФЗ; постановление Правительства Российской Федерации от 30.11.2024 № 1684.

⁷⁹ Часть 11.1 статьи 38 Федерального закона от 21.11.2011 № 323-ФЗ.

утвержденной рецептуре, контролируется каждая варка.

На контроль направляют по 200 мл плотных и по 100 мл жидких питательных сред. На этикетке указывают предприятие-изготовитель, название питательной среды, номер серии, дату приготовления, срок годности. Упаковка должна исключать возможность боя посуды и загрязнения среды при транспортировании.

Препаратами сравнения (контроль) должны быть ранее проверенные качественные питательные среды (аналоги по назначению).

Срок годности готовых питательных сред определен в нормативной документации и инструкциях по применению каждой конкретной среды.

Требования к тест-штаммам

4.4. С целью контроля питательных сред, предназначенных для выявления и культивирования сибиреязвенного микроба, используют штаммы *B. anthracis* СТИ-1 и *B. anthracis* 228/8. В качестве тест-штаммов при определении ингибиторов посторонней микрофлоры используют штаммы *Proteus* (далее – *P.*) *vulgaris* НХ 19 № 222 и *Escherichia* (далее – *E.*) *coli* 18. Для определения дифференцирующих свойств питательных сред используют тест-штамм *B. cereus* 8.

4.5. Тест-штаммы *B. anthracis* должны характеризоваться типичными культурально-морфологическими и биохимическими свойствами. В мазках – крупные грамположительные палочки; на плотных питательных средах (например, агар Хоттингера, МПА, рН 7,2) через 18 – 24 ч роста при температуре плюс $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ – шероховатые серовато-белые колонии с ворсистыми краями («львиная грива»); в жидких питательных средах (например, бульон Хоттингера, МПБ, рН 7,2) через 18 – 24 ч роста при температуре плюс $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ – рост в виде ватных хлопьев, взвешенных комков, без помутнения бульона; не обладают гемолитической, фосфатазной, лецитиназной активностями.

Тест-штамм *B. cereus* 8 должен иметь типичные культурально-морфологические и биохимические свойства. На агаровых средах (например, агар Хоттингера, МПА, рН 7,2) через 18 – 24 ч роста при температуре плюс $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ – бело-серые колонии с извитыми нитями по краям; в жидких питательных средах (например, бульон Хоттингера, МПБ, рН 7,2) через 18 – 24 ч роста при температуре плюс $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ – помутнение среды (возможен крошковатый осадок, пленка и пристеночное кольцо); обладает гемолитической, фосфатазной, лецитиназной активностями.

Тест-штамм *P. vulgaris* НХ 19 № 222 должен быть типичным по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам. В мазках – грамтрицательные палочки; на плотных питательных средах (например, агар Хоттингера, МПА, рН 7,2) через 18 – 24 ч роста при температуре плюс $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ – в виде мутных сероватых роящихся колоний; в жидких средах (например, бульон Хоттингера, МПБ, рН 7,2) через 18 – 24 ч роста при температуре плюс $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ – равномерное помутнение с пленкой на поверхности; должен ферментировать с образованием кислоты и газа глюкозу, маннозу, сахарозу и не расщеплять маннит и арабинозу.

Тест-штамм *E. coli* 18 должен иметь типичные культурально-морфологические и биохимические свойства. В мазках – мелкие

грамотрицательные палочки; на плотных питательных средах (например, агар Хоттингера, МПА, рН 7,2) через 18 – 24 ч роста при температуре плюс $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ – прозрачные колонии с серовато-голубым отливом; в жидких питательных средах (например, бульон Хоттингера, МПБ, рН 7,2) через 18 – 24 ч роста при температуре плюс $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ – помутнение среды, осадок сероватого цвета; должен ферментировать глюкозу, лактозу, маннит, мальтозу до кислоты и газа.

4.6. Тест-штаммы *B. anthracis* и *B. cereus* хранят в лиофилизированном состоянии при температуре плюс 2 – 8 °С.

Тест-штаммы *E. coli* 18 и *P. vulgaris* НХ 19 № 222 хранят в 0,4 % агаре Хоттингера (рН 7,2) под слоем стерильного вазелинового масла или на скошенном агаре Хоттингера (рН 7,2) в запаянных пробирках при температуре плюс 2 – 8 °С. Пересевы культур проводят не менее одного раза в три месяца, но не более четырех раз. По истечении этого срока для работы вскрывают новый объект с культурой.

Подготовка культур

4.7. В ампулы с лиофилизированными культурами *B. anthracis* и *B. cereus* вносят по 2 мл дистиллированной воды. По 0,2 мл из каждой ампулы высевают стерильной пипеткой объемом 1 мл во флаконы с 50 мл бульона Хоттингера (рН 7,2). Через 18 – 24 ч инкубирования при температуре плюс $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ бульонные культуры *B. anthracis* и *B. cereus* по 5 мл высевают с помощью мерных пипеток в матрацы со скошенной средой для спорообразования (например, среда Гладстона-Филдса, голодный LB-агар, рН 7,2). Посевы для получения споровой культуры инкубируют при температуре плюс $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ от 5 до 7 суток. Процесс спорообразования контролируют микроскопией мазков. При наличии в мазках $(95 \pm 5) \%$ спор культуры с матрасов смывают 10 мл дистиллированной воды. Полученные суспензии отбирают в стерильные пробирки и выдерживают при температуре плюс 2 – 8 °С 5 – 7 суток для лизиса оставшихся вегетативных клеток и оседания спор. После этого пипеткой удаляют надосадочную жидкость, а споры суспендируют в 10 мл 30 % стерильного раствора глицерина в дистиллированной воде. Полученную взвесь спор разливают по 2 мл в ампулы вместимостью 6 мл, запаивают, хранят при температуре плюс 2 – 8 °С. Для контроля питательной среды споровую культуру разводят дистиллированной водой в соответствии со стандартным образцом мутности бактериальных взвесей ОСО 42-28-85 (10 МЕ), эквивалентной 1×10^8 спор/мл *B. anthracis*. Из этой взвеси готовят десятикратные разведения до 10^{-6} (1×10^2 спор/мл).

В ампулы с лиофилизированными культурами *E. coli* 18 и *P. vulgaris* НХ 19 № 222 вносят по 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и по 0,2 мл из каждой ампулы вносят стерильной пипеткой в пробирки с бульоном Хоттингера (рН 7,2). Через 18 – 24 ч инкубации при температуре плюс $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ бактериологической петлей делают пересевы из бульона на скошенный агар Хоттингера, посевы инкубируют при температуре плюс $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 18 – 24 ч.

4.8. Определение чувствительности плотных и жидких питательных сред и скорости роста на них возбудителя сибирской язвы. Взвесь спор тест-штаммов *B. anthracis* в количестве 0,1 мл из разведения 10^{-6} (1×10^2 спор/мл) наносят на три чашки Петри с контрольной и испытуемой средой, взвесь распределяют по

поверхности сред покачиванием. Контролем служит заранее отконтролированная питательная среда. Учет результатов проводят визуально через 18 – 24 ч инкубации при температуре плюс $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$. На всех засеянных чашках должен наблюдаться рост тест-штаммов *B. anthracis* в виде шероховатых колоний диаметром не менее двух мм, края колоний с волокнистыми отростками, напоминающими локоны волос (R-форма).

Споровую взвесь тест-штамма сибиреязвенного микроба в количестве 0,1 мл из разведения 10^{-6} (1×10^2 спор/мл) вносят в три пробирки с 10 мл жидкой питательной среды. Контролем должен служить заранее отконтролированный бульон. Учет результатов проводят визуально через 18 – 24 ч инкубации при температуре плюс $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Во всех засеянных пробирках с жидкой питательной средой должен наблюдаться рост тест-штаммов в виде комка ваты на дне пробирки и прозрачного бульона.

Определение стабильности биологических свойств тест-штаммов сибиреязвенного микроба при выращивании их на испытываемых питательных средах

4.9. Стабильность основных свойств сибиреязвенного микроба определяют по отношению числа атипичных по морфологии колоний тест-штаммов к общему числу колоний на чашках с испытываемыми средами. Количество атипичных (RS, S и SM) колоний не должно превышать 10 %.

Определение показателя эффективности

4.10. Оценку проводят с использованием тест-штаммов *B. anthracis* СТИ-1 или *B. anthracis* 228/8.

Плотные питательные среды. Суточную вегетативную культуру смывают с плотной среды 0,9 % раствором натрия хлорида, взвесь разводят в соответствии со стандартным образцом мутности бактериальных взвесей ОСО 42-28-85 (10 МЕ), что соответствует 1×10^7 м.к./мл для вегетативной культуры *B. anthracis*. Полученную взвесь высевают по 0,1 мл в две пробирки с 5 мл испытываемой среды, скошенной таким образом, чтобы в нижней части пробирки не было столбика. Через 18 – 24 ч инкубации при температуре плюс $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ культуру полностью смывают с поверхности среды 2,5 мл 0,9 % раствора хлорида натрия, переносят в стандартную пробирку и добавляют такой объем 0,9 % раствора натрия хлорида, чтобы полученная суспензия соответствовала стандартному образцу мутности бактериальных взвесей ОСО 42-28-85 (10 МЕ) (1×10^7 м.к./мл). Например, на 0,5 мл взвеси, смытой со скошенного агара, потребовалось 3,2 мл 0,9 % раствора хлорида натрия; всего в пробирке будет 0,5 мл + 3,2 мл = 3,7 мл. Выход с 1 мл среды – $3,7 \times 10^9$ м.к.

Жидкие питательные среды. Из вегетативной суточной культуры готовят взвеси с концентрацией 1×10^4 м.к./мл и 1×10^3 м.к./мл, вносят по 1 мл в три пробирки с 9 мл жидкой испытываемой среды. Параллельно делают высеив по 0,1 мл взвеси с концентрацией 1×10^3 м.к./мл на три чашки Петри с питательным агаром микроорганизма (например, агар Хоттингера, МПА, рН 7,2) для определения числа жизнеспособных клеток в посевной дозе (n_0). Через 18 – 24 ч инкубации при плюс

(36 ± 1) °C из каждой пробирки производят высев по 0,1 мл на чашки с тем же питательным агаром (n_1). В случае обильного микробного роста в жидкой среде культуру перед высевом на чашки разводят. Прирост (J) числа микробных клеток после инкубации посевов проводят по формуле (1) (%):

$$J = \frac{n_1 - n_0}{n_1} \cdot 100 \quad (1)$$

4.11. Определение дифференцирующих свойств питательных сред. Для определения дифференцирующих свойств питательной среды используют микробные взвеси *B. anthracis* СТИ и *B. cereus* 8, приготовленные в соотношении 1:1 из разведения 10^{-5} (1×10^3 спор/мл). По 0,1 мл смеси засевают на 3 чашки Петри с испытуемой и контрольной средами, содержащими 0,01 % фенолфталеинфосфата натрия. Через 18 – 24 ч инкубации при температуре плюс (36 ± 1) °C для дифференциации *B. anthracis* СТИ и *B. cereus* 8 в отдельную крышку от чашки Петри помещают фильтровальную бумагу и наливают на нее 1 – 2 мл 29 % водного раствора аммиака. Чашку с посевом (агаром вверх) без крышки помещают на 5 – 10 с в крышку с аммиаком. Колонии *B. anthracis* СТИ не должны изменять своего цвета, колонии *B. cereus* 8 должны окрашиваться в розовый или красный цвет.

Контроль ингибирующих свойств питательных сред

4.12. При выделении возбудителя сибирской язвы из биологического материала и объектов внешней среды для подавления сопутствующей микрофлоры применяют питательные среды, содержащие ингибиторы роста. Для определения показателя ингибиции на три чашки Петри с контрольной и испытуемой средами наносят по 0,1 мл смеси тест-штаммов, содержащей *B. anthracis* СТИ-1 из разведения 10^{-5} (1×10^3 спор/мл), *E. coli* 18 из 10^{-3} (1×10^6 м.к./мл), *P. vulgaris* НХ 19 № 222 из 10^{-3} (1×10^6 м.к./мл) и 0,9 % раствора натрия хлорида в соотношении 0,5:0,5:0,5:3,5. Смесь распределяют по поверхности среды. Через 18 – 24 ч инкубации при температуре плюс (36 ± 1) °C проводят учет результатов. На питательной среде должен отсутствовать рост микробов-ассоциантов *E. coli* 18 и *P. vulgaris* НХ 19 № 222.

4.13. Критерии пригодности диагностических сред. Плотные питательные среды считаются пригодными, если они обеспечивают рост 50 % тест-штаммов сибиреязвенного микроба при посевной дозе 100 спор и не менее одной колонии на каждой чашке при посеве 10 спор *B. anthracis* СТИ-1 и 228/8.

Жидкие среды считают пригодными, если наблюдается рост сибиреязвенного микроба во всех пробирках при посеве 100 спор на 10 мл среды. По скорости роста среда считается пригодной, если через 18 – 24 ч в бульоне отмечается интенсивный рост культуры, соответствующий п. 4.5 приложения 4 к настоящим МУ.

Средства измерений, испытательное, вспомогательное оборудование, расходные материалы, применяемые для исследований на сибирскую язву

Наименование средств измерения	Технические характеристики	Область применения
Средства измерений		
Весы электронные лабораторные	Предел взвешивания 0,5 – 1220 г, погрешность $\pm 0,2$ г, ГОСТ Р 53228-2008	Обеспечение лабораторных исследований
Дозатор пипеточный одноканальный 0,5-10 мкл	Диапазон объема дозирования 0,5 – 10 мкл, погрешность $\pm (5,0 – 1,0)$ %	Обеспечение лабораторных исследований
Дозатор пипеточный одноканальный 10-100 мкл	Диапазон объема дозирования 10 – 100 мкл, погрешность $\pm (3,0 – 0,8)$ %	Обеспечение лабораторных исследований
Дозатор пипеточный одноканальный 100-1000 мкл	Диапазон объема дозирования 100 – 1000 мкл, погрешность $\pm (2,0 – 0,6)$ %	Обеспечение лабораторных исследований
Анализатор жидкости (рН-метр)	Диапазон измерений рН 0 – 14 ед. рН, погрешность $\pm 0,1$ ед. рН	Обеспечение лабораторных исследований
Термометр	Диапазон измерений температуры от минус 35 °С до плюс 50 °С, погрешность от минус 35 °С до 0 °С $\pm 1,5$ °С; от 0 °С до плюс 50 °С $\pm 1,0$ °С, цена деления 1,0 °С	Обеспечение лабораторных исследований
Прибор для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени планшетного или роторного типа	Точность температуры $\pm 0,5$ °С, скорость нагрева 2,1 – 6,1 °С/с, скорость охлаждения 1,0 – 4,5 °С/с, дискретность 0,1, температурный диапазон от плюс 35 °С до плюс 99 °С	ПЦР-исследования
Спектрофотометр планшетный	Диапазон измерения оптической плотности 0 – 3,5 ед, диапазон сканирования 400 – 700 нм, фильтры 450, 492 нм, точность измерения $\pm 0,01$	Иммунологические исследования
Испытательное оборудование		
Термостат лабораторный электрический	Диапазон температуры от плюс 5 °С до плюс 80 °С, погрешность $\pm 1,0$ °С	Обеспечение лабораторных исследований

Наименование средств измерения	Технические характеристики	Область применения
СО ₂ -инкубатор	Диапазон температуры от плюс 7 °С до плюс 60 °С, погрешность ± 1,0 °С, диапазон СО ₂ 0 – 20 %	Бактериологические исследования
Миницентрифуга	Скорость центрифугирования до 13400 об/мин, ротор для микропробирок объемом 1,5 – 2,0 мл	Подготовка проб Экстракция ДНК
Миницентрифуга-вортекс	Диапазон регулирования скорости от 1000 до 6000 об/мин	Подготовка проб Экстракция ДНК Приготовление ПЦР-смесей
Термостат твердотельный для микропробирок	Диапазон поддержания температуры от комнатной до 99 °С, точность поддержания температуры ± 1 °С	Подготовка проб Экстракция ДНК
Шейкер-термостат для планшетов	Диапазон регулирования скорости движения 100 – 1300 об/мин, температура нагрева до плюс 60 °С, погрешность ± 1,0 °С, амплитуда вращения 1,5 мм	Иммунологические исследования
Водяная баня	Диапазон температуры от плюс 5 °С до плюс 99,9 °С, погрешность ± 1,0 °С	Бактериологические исследования
Вспомогательное оборудование		
Аспиратор (отсасыватель медицинский)	-	Экстракция ДНК
Микроскоп световой биологический	Окуляры широкопольные 10/18, объективы ахроматические 10х, 40х, 100х (масляный)	Бактериоскопические исследования (световая микроскопия)
Микроскоп люминесцентный биологический	Окуляры широкопольные 10/18, объективы ахроматические 40х, 100х (масляный) длина волны возбуждающего света 340 – 360 нм, длина волны флуоресценции 400 – 440 нм	Бактериоскопические исследования (люминесцентная микроскопия)
Паровой стерилизатор (автоклав) для обеззараживания	Режим обеззараживания: давление 2,0 кгс/см ² , температура плюс 132 °С, погрешность ± 2 °С	Обеспечение лабораторных исследований
Паровой стерилизатор (автоклав) для стерилизации	Режим стерилизации: давление 1,1 кгс/см ² , температура плюс 120 °С, погрешность ± 2 °С	Обеспечение лабораторных исследований
Сухожаровой шкаф стерилизационный	Режим стерилизации температура плюс (180 ± 4,0) °С	Обеспечение лабораторных исследований
Облучатели бактерицидные (передвижные и стационарные)	-	Обеспечение лабораторных исследований
Аквадистиллятор	-	Получение дистиллированной воды
Бокс микробиологической безопасности III класса	Средняя скорость входящего потока через перчаточный порт (при одной снятой перчатке) ≥ 0,70 м/с, расход входящего потока Q ≥ 0,05 м ³ /с на м ³ бокса, разрежение в рабочей камере ≥ 200 Па,	Разбор, сортировка, пробоподготовка исследуемого материала

Наименование средств измерения	Технические характеристики	Область применения
	ГОСТ Р ЕН 12469-2010	Бактериологические исследования Биологический метод исследования
Бокс микробиологической безопасности II класса	Средняя скорость нисходящего потока 0,25 – 0,50 м/с, средняя скорость входящего потока ≥ 40 м/с, однородность нисходящего потока ± 20 % от среднего значения, направление нисходящего потока – по всему сечению камеры бокса, направление входящего потока – вдоль всего сечения рабочего проема, ГОСТ Р ЕН 12469-2010	Бактериологические исследования Подготовка проб Экстракция ДНК Приготовление ПЦР-смесей Внесение ДНК в ПЦР-смесь
ПЦР-бокс	Средняя скорость входящего потока от 0,70 до 1,00 м/с, направление входящего потока – вдоль всего сечения рабочего проема	Приготовление ПЦР-смесей Внесение ДНК в ПЦР-смесь
Холодильник бытовой электрический	От плюс 2 °С до плюс 8 °С (холодильная камера), от минус 16 °С до минус 20 °С (морозильная камера)	Хранение диагностических препаратов и реактивов Хранение исследуемого материала Хранение изолятов ДНК
Емкости для содержания биопробных животных (например, вентилируемые системы, клетки с НЕРА-фильтрами, банки, металлические ящики)	-	Содержание животных в условиях контролируемой микробиологической контаминации
Расходные материалы		
Стандартный образец мутности бактериальных взвесей ОСО 42-28-85 (10 МЕ)	Оптическая плотность 0,46, погрешность $\pm 0,022$	Бактериологические исследования
Чашки бактериологические Петри пластиковые одноразовые	Стерильные, диаметр 94 мм, 100 мм	Бактериологические исследования
Чашки бактериологические Петри стеклянные	ГОСТ 23932-90, диаметр 94 мм, 100 мм	Бактериологические исследования
Пробирки бактериологические стеклянные	Типы П1, П2, ГОСТ 25336-82	Бактериологические исследования
Петля бактериологическая	Одноразового или многоразового применения, объемом 1, 10 мкл	Бактериоскопические исследования Бактериологические исследования
Пипетки мерные градуированные	Одноразового или многоразового применения, объемом 1, 2, 5, 10 мкл	Бактериоскопические исследования Бактериологические исследования
Стекла предметные	Размер 25 x 75 мм, толщина 1,0 – 1,2 мм	Бактериоскопические исследования

Наименование средств измерения	Технические характеристики	Область применения
Емкость для фиксации мазков	-	Бактериоскопические исследования
Масло иммерсионное	Для световой микроскопии	Бактериоскопические исследования
Масло иммерсионное нефлуоресцирующее	Для люминесцентной микроскопии	Бактериоскопические исследования
Шприцы	Объем 2,0 – 5,0 мл	Биологический метод исследования
Микроцентрифужные пробирки	Диапазон рабочих температур от минус 80 °С до плюс 121 °С, диапазон центрифугирования до 20000 g, степень чистоты «PCR clean», объем 1,5 – 2,0 мл	ПЦР-исследования Бактериологические исследования Биологический метод исследования
Пробирки с винтовой горловиной, снабженные крышкой с петлей и кольцевой прокладкой	Диапазон рабочих температур от минус 80 °С до плюс 121 °С диапазон центрифугирования до 20000 g, степень чистоты «PCR clean», объем 1,5 – 2,0 мл	ПЦР-исследования
Тонкостенные полипропиленовые пробирки для ПЦР	Диапазон рабочих температур от минус 80 °С до плюс 121 °С диапазон центрифугирования до 20000 g, степень чистоты «PCR clean», объем 0,2, 0,5, 0,6 мл	ПЦР-исследования
Наконечники универсальные для дозаторов	Степень чистоты «PCR clean», объем до 100, 200, 1000 мкл	ПЦР-исследования
Наконечники универсальные для дозаторов с фильтром	Степень чистоты «PCR clean», объем до 100, 200, 1000 мкл	ПЦР-исследования
Штативы для микропробирок	Универсальные	ПЦР-исследования
Штативы – рабочее место для микропробирок	Универсальные	ПЦР-исследования
Штативы для наконечников	Универсальные	ПЦР-исследования
Стойки для дозаторов	Универсальные	ПЦР-исследования
Штативы для бактериологических пробирок	Универсальные	Бактериологические исследования
Колбы конические	Стеклопосудные плоскодонные, объем 100 мл, 250 мл, 500 мл, 1000 мл, ГОСТ 25336-82	Бактериологические исследования
Цилиндры	Стеклопосудные, объем 25 мл, 50 мл, 100 мл, 250 мл, 500 мл, 1000 мл, ГОСТ 1770-74	Бактериологические исследования
Ступки фарфоровые с пестиками	-	Подготовка проб Бактериологические исследования Биологический метод исследования
Ножницы хирургические (Купера)	-	Подготовка проб Бактериологические исследования

Наименование средств измерения	Технические характеристики	Область применения
		Биологический метод исследования
Ножницы прямые	-	Подготовка проб Бактериологические исследования Биологический метод исследования
Пинцеты анатомические	-	Подготовка проб Бактериологические исследования Биологический метод исследования
Пинцеты хирургические	-	Подготовка проб Бактериологические исследования Биологический метод исследования
Скальпели	-	Подготовка проб Бактериологические исследования Биологический метод исследования
Емкости для предстерилизационной обработки	Емкости-контейнеры полимерные для дезинфекции и предстерилизационной обработки медицинских изделий	Подготовка проб Бактериоскопические исследования Бактериологические исследования Биологический метод исследования ПЦР-исследования
Часы песочные (на 1, 2 и 5 мин)	-	Бактериоскопические исследования Бактериологические исследования
Комплекты защитной одежды, соответствующие защитным характеристикам противочумных костюмов	-	Отбор материала Подготовка материала Бактериоскопические исследования Бактериологические исследования Биологический метод исследования ПЦР-исследования
Перчатки медицинские	-	Отбор материала Подготовка материала Бактериоскопические исследования Бактериологические исследования Биологический метод исследования ПЦР-исследования
Респираторы FFP3	-	Разбор, сортировка Подготовка проб Биологический метод исследования

Наименование средств измерения	Технические характеристики	Область применения
Пероксид водорода	ГОСТ 177-88	Отбор материала Подготовка материала Бактериоскопические исследования Бактериологические исследования Биологический метод исследования ПЦР-исследования
Моющее средство	-	Обеспечение лабораторных исследований
Средство для деконтаминации от нуклеиновых кислот и ампликонов	Разрушение нуклеиновых кислот до неамплифицируемых фрагментов	ПЦР-исследования
Спирт этиловый (95 – 96 % об.)	-	Обеспечение лабораторных исследований
Индикаторы контроля процессов обеззараживания химический для автоклавов	Контролируемые режимы плюс 132°C – 90 мин, плюс 134°C – 60 мин	Обеспечение лабораторных исследований
Индикаторы контроля процессов обеззараживания биологический для автоклавов	Контролируемый режим плюс 134°C – 60 мин	Обеспечение лабораторных исследований
Индикаторы для контроля процесса стерилизации сухожарового шкафа	Контролируемые режимы: плюс 120°C – 45 мин, плюс 126°C – 30 мин, плюс 132°C – 20 мин	Обеспечение лабораторных исследований
Пакеты для автоклавирования	-	Обеспечение лабораторных исследований
Пакеты для медицинских отходов классов Б, В	-	Обеспечение лабораторных исследований
<p>Примечание: допускается использовать средства измерений, испытательное и вспомогательное оборудование с аналогичными или лучшими техническими характеристиками. Допускается использовать расходные материалы с аналогичными или лучшими характеристиками.</p>		

Приготовление рабочих растворов и реагентов

6.1. Фиксирующая жидкость для фиксации мазков. Для приготовления фиксирующей жидкости с содержанием 3 % раствора перекиси водорода во флакон наливают 180 мл 95 – 96 % этилового спирта и 20 мл 30 % пергидроля. Содержание перекиси водорода в пергидроле определяют в соответствии с документами по стандартизации⁸⁰. Содержание перекиси водорода в рабочем растворе можно определять с применением индикаторных химических полосок для экспресс-контроля концентрации перекиси водорода. Фиксирующую жидкость можно не менять в течение месяца, при этом флакон закрывается притертой пробкой. Для хранения лучше использовать флакон из темного стекла. Флакон из обычного стекла хранится в темном ящике (ящик лабораторного стола, холодильник). Приготовленные мазки из культур высушивают на воздухе, затем опускают во флакон с фиксирующей жидкостью. Через 30 мин стекла с мазками извлекают и просушивают на воздухе. Нежелательно фиксировать мазки более 30 мин. Можно хранить фиксированные мазки в закрытой чашке Петри в холодильнике при температуре плюс 2 – 8 °С.

6.2. Раствор по Ребигеру. 15 – 20 г генцианвиолета растворяют в 100 мл 40 % формалина. Раствор выдерживают при комнатной температуре в течение нескольких часов, после чего фильтруют.

6.3. Карболовый фуксин Циля. Тщательно растирают в ступке 1 г основного фуксина и 5 г кристаллической карболовой кислоты с несколькими каплями глицерина. Во время растирания при постоянном помешивании понемногу приливают 10 мл 95 – 96 % этилового спирта и 100 мл дистиллированной воды. Краска готова к употреблению через 2 – 3 дня после изготовления, сохраняется длительно.

6.4. Использование 0,05 – 0,1 % раствора Твина-80 и определение концентрации жизнеспособных спор. Для приготовления 0,1 – 0,05 % раствора Твин-80 отливают в пробирку в количестве 1 – 3 мл и подогревают в твердотельном термостате в течение 5 – 10 мин при температуре плюс 56 °С. Затем во флакон, содержащий 100 мл стерильной дистиллированной воды, добавляют одну каплю (для приготовления 0,05 % раствора) или две капли (для приготовления 0,1 % раствора) подогретого Твина-80 и содержимое тщательно перемешивается. Разводящая жидкость готова для использования и может храниться в течение 3 – 5 дней.

Для определения концентрации живых спор чашечным методом делают ряд последовательных десятикратных разведений исходной взвеси спор с использованием 0,05 – 0,1 % раствора Твина-80. Из разведения 10^{-7} 10^{-8} и 10^{-9} взвеси спор делают высевы по 0,1 мл на чашки с агаром Хоттингера (рН 7,2). Для каждого разведения берут не менее трех чашек. Равномерное распределение

⁸⁰ ГОСТ 177-88 «Водорода перекись. Технические условия», введенный постановлением Госстандарта СССР от 29.06.1988 № 2417.

суспензии по поверхности агара проводят путем покачивания чашек. После полного впитывания взвеси, посеvy помещают в термостат при температуре плюс $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ на 18–24 ч. Среднее значение количества выросших колоний, умноженное на 10 и на кратность разведения, составляет значение концентрации жизнеспособных спор в исходной взвеси. Суспензию спор, приготовленную на Твине-80, не рекомендуется использовать для заражения или вакцинации животных.

6.5. 0,5 М раствор ЭДТА (рН 8,0). 18,61 г соли помещают в химический стакан на 100 мл, добавляют 80 мл дистиллированной воды, интенсивно размешивают на магнитной мешалке и доводят рН до 8,0 с помощью натрия гидроокиси. Раствор хранят в темной полипропиленовой посуде при температуре плюс $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ до 3 месяцев.

6.6. 1 М раствор трис-НСl (рН 8,0). Навеску трис-(оксиметил)-аминометана – 6,5 г помещают в химический стакан на 50 мл, добавляют 25 мл дистиллированной воды. После полного растворения соли доводят дистиллированной водой до 50 мл и выставляют рН 8,0 с помощью концентрированной кислоты соляной. Раствор хранят при температуре плюс $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ до 3 месяцев.

6.7. 0,1 М раствор трис-НСl (рН 6,4). Навеску трис-(оксиметил)-аминометана – 1,21 г помещают в химический стакан на 100 мл, добавляют 50 мл дистиллированной воды. После полного растворения соли доводят дистиллированной водой до 100 мл. Доводят рН до 6,4 с помощью концентрированной соляной кислоты. Раствор хранят при температуре плюс $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ до 3 месяцев.

6.8. 5 М раствор натрия хлорида. Навеску натрия хлорида – 2,922 г помещают в химический стакан на 50 мл и добавляют 8 мл дистиллированной воды. Раствор хранят в стеклянной посуде при температуре плюс $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ до 3 месяцев.

6.9. 10 N раствор натрия гидроокиси. Навеску натрия гидроокиси – 40 г помещают в мерную колбу на 100 мл, добавляют 50 мл дистиллированной воды. После полного растворения натрия гидроксида доводят дистиллированной водой до 100 мл. Раствор хранят в непрозрачной полипропиленовой посуде при комнатной температуре до шести месяцев.

6.10. 10 % раствор фенолфталеинфосфата натрия в аммиачном буфере. В емкости из темного стекла смешивают 50 мл 1 N раствора NH_4OH и 50 мл 1 N раствора NH_4Cl , к смеси добавляют 10,0 г фенолфталеинфосфата натрия и перемешивают до полного растворения. рН доводят до 9,2. Раствор стерилизуют фильтрованием через фильтры с диаметром пор 0,22 – 0,45 мкм.

Питательные среды, применяемые для выделения и идентификации возбудителя сибирской язвы⁸¹

7.1. Питательная среда для выделения возбудителя сибирской язвы сухая (№ ФСР 2011/10648) предназначена для выделения возбудителя сибирской язвы от больных людей, животных, свежих и загнивших трупов, из материалов растительного и животного происхождения, а также из объектов окружающей среды при проведении бактериологических исследований в клинической и санитарной микробиологии. Промышленная коммерческая питательная среда состоит из основы, представляющей мелкодисперсный порошок светло-желтого цвета и селективной добавки. В состав среды входят панкреатический гидролизат рыбной муки, натрий хлористый, триметоприм, полимиксина В сульфат, агар микробиологический.

7.2. Агар Хоттингера (№ ФСР 2009/05571) представляет собой непрозрачный гель светло-коричневого цвета. Содержит гидролизат Хоттингера, натрия хлорид, агар микробиологический. Питательная среда стерильна, готова к применению, рН $7,2 \pm 0,1$. Перед исследованием питательную среду расплавляют, охлаждают до температуры плюс $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, после чего с соблюдением правил асептики разливают по 20–25 мл в чашки Петри и подсушивают в течение 40 мин. Готовые к использованию чашки хранят не более 3–4 суток при температуре плюс $(4 \pm 2)\text{ }^{\circ}\text{C}$.

7.3. МПА, готовый к применению (№ ФСР 2008/03651) содержит пептон ферментативный, экстракт мясной, натрий хлористый, агар микробиологический. Питательная среда стерильна, готова к применению (рН 7,2). Перед исследованием питательную среду расплавляют, охлаждают до температуры плюс $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, после чего с соблюдением правил асептики разливают по 20–25 мл в чашки Петри и подсушивают в течение 40 мин. Готовые к использованию чашки хранят не более 3–4 суток при температуре плюс $(4 \pm 2)\text{ }^{\circ}\text{C}$.

7.4. Бульон Хоттингера (№ ФСР 2009/05572) представляет собой прозрачную жидкость от светло-желтого до светло-коричневого цвета. Содержит гидролизат Хоттингера, натрия хлорид и воду дистиллированную. Питательная среда стерильна, готова к применению (рН 7,2).

7.5. МПБ, готовый к применению (№ ФСР 2008/03652) представляет собой прозрачную жидкость от светло-желтого до светло-коричневого цвета. Содержит пептон ферментативный, экстракт мясной, натрий хлористый. Питательная среда стерильна, готова к применению (рН 7,2).

7.6. Селективная дифференциально-диагностическая среда с 0,01 % фенолфталеинфосфатом натрия. В расплавленный питательный агар (рН 7,2) добавляют полимиксин сульфат М и триметоприм из расчета 25 мкг/мл, хорошо перемешивают. Перед розливом в чашки Петри в остуженную до температуры плюс $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ среду добавляют раствор фенолфталеинфосфата натрия, предварительно прогретого при температуре плюс $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 20 мин, до конечной

⁸¹ Примечание: допускается использование других питательных сред с аналогичными характеристиками.

концентрации 0,01 %. После перемешивания среду разливают в чашки Петри и подсушивают в течение 1,5 ч с открытыми крышками. Чашки с агаром можно хранить в холодильнике при температуре плюс $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ 2 – 3 суток.

7.7. Для приготовления селективной дифференциально-диагностической среды с динатриевой солью пара-нитрофенилфосфата (p-NPP) на первом этапе подготавливают основные растворы дифференциально-диагностического и селективных компонентов. Навеску p-NPP 500 мг помещают в пробирку, растворяют в минимальном объеме (до 1 мл) стерильной дистиллированной воды, прогревают на водяной бане при температуре плюс 56°C в течение 30 мин 1000 мг цефтазидима во флаконе растворяют в 10 мл стерильной дистиллированной воды. 50 мг (50 000 ЕД) амфотерицина В во флаконе растворяют в 5 мл стерильной дистиллированной воды. Далее агар Хоттингера (рН 7,2) во флаконах расплавляют в кипящей водяной бане, затем охлаждают до температуры плюс 50°C . Перед розливом в чашки к 1 л агара добавляют 1 мл л р-NPP (500 мг/л), 0,2 мл цефтазидима (20 мг/л), 0,1 мл амфотерицина В (10 мг/л) из основных растворов. Приготовленную среду тщательно перемешивают, разливают в чашки Петри, подсушивают в течение 1,5 – 2 ч. Так как в состав среды включен раствор амфотерицина В, чашки со средой до использования следует поместить в защищенное от света место. Чашки со средой после розлива можно хранить в условиях холодильника при температуре плюс $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 1 – 2 суток.

7.8. Дифференциально-диагностические среды для постановки теста на щелочную фосфатазу. Среда для постановки теста на щелочную фосфатазу с 0,01 % фенолфталеинфосфатом натрия или 0,05 % динатриевой солью пара-нитрофенилфосфата готовят в соответствии с п.п. 6.6, 6.7 приложения 7 к настоящему МУ, но без добавления селективных компонентов.

7.9. Для 1 % бикарбонатно-сывороточный агара предварительно готовят 10 % раствор NaHCO_3 . Для этого 10 г пищевой соды растворяют в 100 мл стерильной дистиллированной воды при легком подогревании на пламени спиртовки. Затем в 100 мл расплавленного и остуженного до температуры плюс 50°C агара Хоттингера добавляют 10 мл 10 % раствора соды, 10 % инактивированной при температуре плюс 56°C в течение 30 мин сыворотки крови крупного рогатого скота (№ ФСР 2007/00168) или сыворотки лошадиной нормальной для культивирования микроорганизмов (№ ФСР 2008/03463) или аналогичной. После розлива в чашки Петри и подсушивания агар можно использовать для посевов. Хранить агар не рекомендуется.

7.10. Для приготовления кровяного агара у барана стерильно отбирают кровь из яремной вены в дефибринатор (флакон со стеклянными бусами) при постоянном его круговом покачивании. После окончательного формирования на бусах плотного сгустка фибрина (15 – 20 мин) кровь фильтруют через стерильную марлевую салфетку. Дефибрированную кровь добавляют в количестве 3 – 5 % в расплавленный и остуженный до температуры плюс 50°C агар Хоттингера (рН 7,2), который сразу же разливают в чашки Петри.

7.11. Жидкая желточная среда Дрожевкиной. Состоит из 1 части куриного желтка и 9 частей 0,9 % раствора хлорида натрия. Приготовление и розлив производят стерильно без последующей стерилизации. Помещают на двое суток при температуре плюс $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ для проверки на стерильность.

7.12. Среда с лецитином. В расплавленный и охлажденный до температуры плюс 50 °С агар Хоттингера (рН 7,2) добавляют лецитин в количестве 0,2 – 0,4 % и агар сразу же разливают в чашки Петри.

7.13. Среда Гладстона-Филдса (в модификации). Делают навески компонентов среды:

- панкреатический гидролизат казеина – 5,0 г/л;
- дрожжевой экстракт – 1,5 г/л;
- $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ – 3,0 г/л;
- KH_2PO_4 1,0 – г/л;
- Na_2SO_4 0,3 – г/л;
- $CaCl_2$ безводный – 0,1 г/л;
- $MnSO_4 \times 3H_2O$ – 0,03 г/л;
- $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,05 г/л;
- $Fe_2(SO_4)_3 \times 9H_2O$ – 0,01 г/л;
- агар микробиологический – 14,0 – 18,0 г/л.

К ингредиентам среды добавляют дистиллированную воду до получения 1 л, прогревают при температуре плюс 80 – 85 °С до полного растворения, стерилизуют автоклавированием при температуре плюс (121 ± 1) °С в течение 20 мин. Среду охлаждают до температуры плюс 50 °С и разливают на бактериологические матрасы. Значение рН готовой среды составляет 7,2.

7.14. Для приготовления LB-агара в 1 л дистиллированной воды размешивают 10,0 г пептона, 5,0 г дрожжевого экстракта, 10,0 г натрия хлорида и 15,0 г агар-агара. Устанавливают конечное значение (рН 7,2). Подогревают до полного растворения частиц. Среду стерилизуют автоклавированием при температуре плюс (121 ± 1) °С в течение 20 мин. Разливают во флаконы. Готовую среду хранят при температуре плюс (4 ± 2) °С в течение месяца.

Аналогичным образом готовят LB-бульон, но без добавления агар-агара. рН устанавливают 7,2.

При приготовлении голодного агара (для получения спор) добавляют уменьшенное количество ингредиентов: пептона – 5,0 г, дрожжевого экстракта – 2,5 г, натрия хлорида – 5,0 г, агар-агара – 15,0 г. Доводят рН до 7,2.

7.15. Минимальная среда «9АТ». Для приготовления среды «9АТ» необходимы следующие ингредиенты:

- $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ – 4,5 г/л;
- KH_2PO_4 – 0,5 г/л;
- $(NH_4)_2SO_4$ – 2,0 г/л;
- $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,025 г/л;
- $MnSO_4 \times H_2O$ – 0,015 г/л;
- $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 0,015 г/л;
- $CaCl_2 \times 2H_2O$ – 0,05 г/л;
- $C_6H_5O_7Na_3 \times 3H_2O$ 0,5 г/л;
- d-глюкоза 4,0 – г/л;
- l-аланин 0,02 – г/л;
- l-гистидин 0,02 – г/л;
- l-глутаминовая кислота – 0,02 г/л;
- глицин – 0,02 г/л;

- l-лизин – 0,02 г/л;
- l-метионин – 0,02 г/л;
- l-пролин – 0,02 г/л;
- l-серин – 0,02 г/л;
- l-треонин – 0,02 г/л;
- тиамин – 0,001 г/л;
- агар микробиологический (бактериологический) с прочностью по Валенту не ниже 200 г – 13,0;
- вода дистиллированная – до 1 л.

Аминокислоты и соли растворяют в дистиллированной воде, растворы объединяют, добавляют агар и доводят дистиллированной водой до 1 л, стерилизуют автоклавированием при температуре плюс $(121 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 20 мин. Тиамин растворяют в 1 мл бидистиллированной воды и стерилизуют фильтрацией через мембранный фильтр. Среду охлаждают до температуры плюс 50°C , добавляют тиамин и разливают на чашки Петри. Значение pH готовой среды составляет 7,5 – 7,6.

7.16. Среду «СОПЭК» готовят путем растворения ингредиентов в 425 мл дистиллированной воды, в следующем соотношении (г): l-аланин – 0,035, l-аргинин HCl – 0,200, l-аспарагиновая кислота – 0,250, l-валин – 0,240, l-гистидин HCl – 0,074, глицин – 0,090, l-глутамат натрия – 0,820, l-изолейцин – 0,230, l-лейцин – 0,300, l-лизин – 0,300, l-метионин – 0,100, l-пролин – 0,060, l-серин – 0,310, l-треонин – 0,160, l-тирозин – 0,200, l-триптофан – 0,047, l-фенилаланин – 0,170, l-цистин – 0,034, аденин – 0,003, урацил – 0,002, тиамин HCl – 0,001, CaCl₂ – 0,008, MgSO₄ × 7H₂O – 0,026, MnSO₄ × H₂O – 0,002, FeSO₄ × H₂O – 0,002, K₂HPO₄ × 3H₂O – 3,920, NaHCO₃ – 8,0, d (+) глюкоза – 2,5. Значение pH готовой среды составляет 8,0.

Полученный раствор питательной основы среды стерилизуется фильтрацией через мембранный фильтр. Навеску агарозы 15 г расплавляют в 500 мл дистиллированной воды и стерилизуют автоклавированием при температуре плюс 121°C в течение 20 мин. К расплавленной и охлажденной до температуры плюс 50°C агарозе стерильно добавляют подогретый до температуры плюс 50°C раствор питательной основы в объеме 425 мл и противосибиреязвенный глобулин жидкий в объеме 75 мл, перемешивают и разливают в чашки Петри по 10 – 12 мл.

7.17. Транспортная среда № 1: 1-ый вариант – NaCl 137 мМ, KCl 2,7 мМ, NaH₂PO₄ 10 мМ, K₂HPO₄ 2 мМ, сыворотка крупного рогатого скота 20 %; 2-ой вариант – сахароза 0,218 М, KH₂PO₄ 0,0038 М, K₂HPO₄ 0,0072 М, БСА 1 %.

7.18. Транспортная среда № 2 (ESP): саркозил 1 %, ЭДТА 0,05 М, свободная от нуклеаз проназа Е 1 мг/мл.

7.19. Тиогликолевая среда: навеску 30 г порошка коммерческой питательной среды развести в 1 литре дистиллированной воды. Часто помешивая, довести до кипения. Кипятить в течение 1 мин до полного растворения. Разлить в подходящие емкости и стерилизовать 15 мин при температуре плюс $(121 \pm 1)^\circ\text{C}$. Готовая среда представляет собой янтарный полужидкий гель с розовым верхним слоем.

7.20. Полужидкий агар 0,4 – 0,7 %.

**Отличительные признаки штаммов сибиреязвенного микроба
различных типов**

Признаки	Типы по Thome		
	I	II	III
Морфология колоний на плотных питательных средах			
На агаре при выращивании на воздухе	R-форма	SM-форма	R-форма
На 1 %-ном бикарбонатно-сывороточном агаре в атмосфере с 10 – 50 % CO ₂	SM-форма	SM-форма	R-форма
Капсулообразование			
На агаре при выращивании на воздухе	Отсутствует	Происходит	Отсутствует
На 1%-ном бикарбонатно-сывороточном агаре в атмосфере с 10 – 50 % CO ₂	Происходит	Происходит	Отсутствует
В организме животных	Происходит	Происходит	Отсутствует
Морфология роста в жидких питательных средах			
Рост в бульоне	Бульон прозрачный, придонный рост в виде «комочка ваты»	Бульон мутноватый, придонный рост в виде «комочка ваты»	Бульон прозрачный, придонный рост в виде «комочка ваты»
Вирулентность			
Для белых мышей	При заражении дозами 1 – 10 ⁴ спор вызывает гибель на 1 – 5 сутки	При заражении дозами 1 – 10 ⁴ спор вызывает гибель на 1 – 5 сутки	Вызывает гибель на 1 – 10 сутки в дозах ≥ 10 ⁴ спор, в меньших дозах – отек подкожной клетчатки в месте введения на 2 – 3 сутки
Для морских свинок	При заражении дозами 1 – 10 ⁴ спор вызывает гибель на 1 – 5 сутки	При заражении дозами 1 – 10 ⁴ спор вызывает гибель на 1 – 5 сутки	Вызывает гибель единичных особей от доз свыше 10 ⁴ спор, в меньших дозах – отек подкожной клетчатки в месте введения на 2 – 3 сутки
Для кроликов	При заражении дозами 1 – 10 ⁴ спор вызывает гибель на 1 – 5 сутки	Не вызывает гибели при заражении дозами до 10 ⁶ спор	Не вызывает гибели при заражении дозами до 10 ⁶ спор

Идентификация культур возбудителя сибирской язвы



Иллюстрации

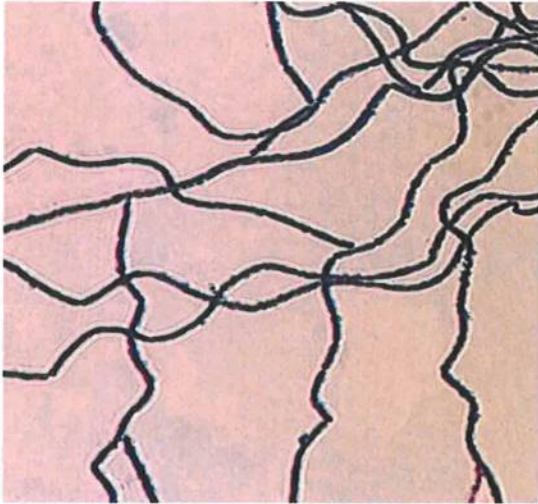


Рисунок 1. Морфология вегетативных клеток *B. anthracis* в мазках с питательного агара – окраска по Граму

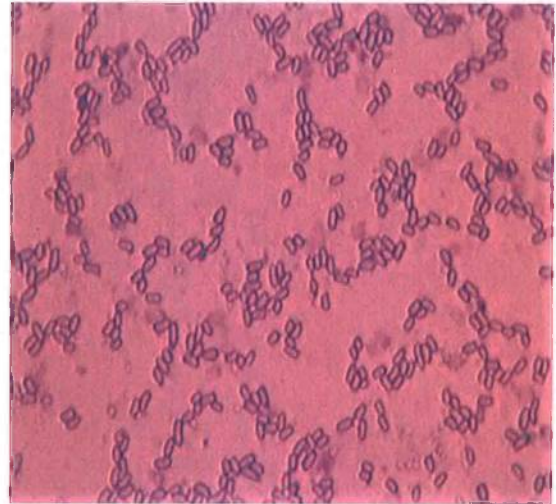


Рисунок 2. Морфология спор *B. anthracis* в мазках со среды Гладстона-Филдса через 7 суток инкубации – окраска по Ребигеру

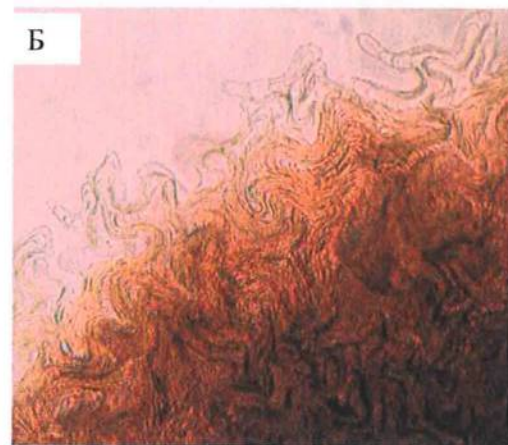
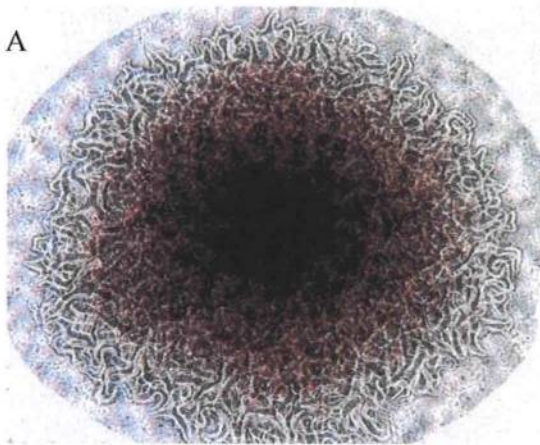


Рисунок 3. Типичная колония *B. anthracis* на плотной питательной среде (А) и край колонии при микроскопии (Б)

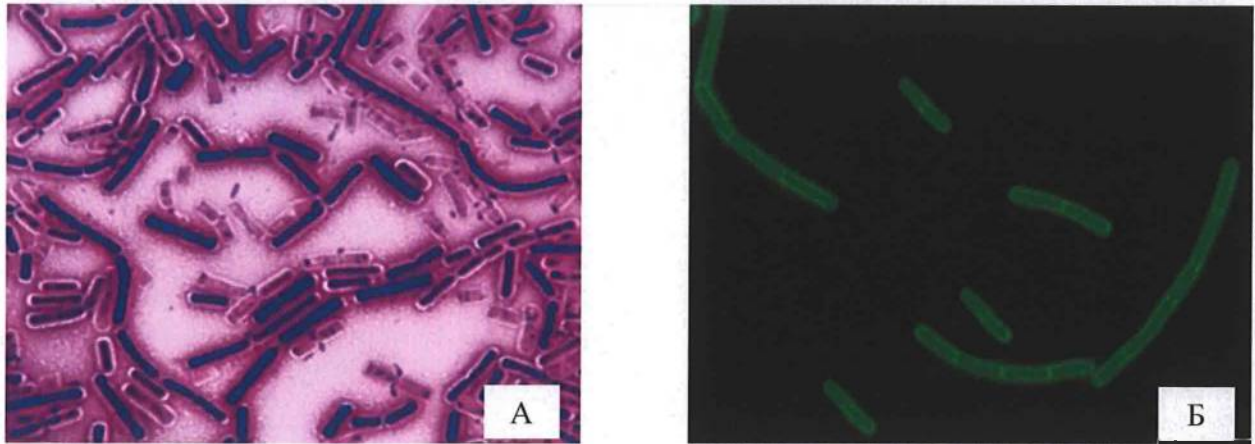


Рисунок 4. Капсула *B. anthracis*. Окраска по Ребигеру (А) и иммуноглобулинами диагностическими флуоресцирующими сибирезвеньными вегетивными (Б)

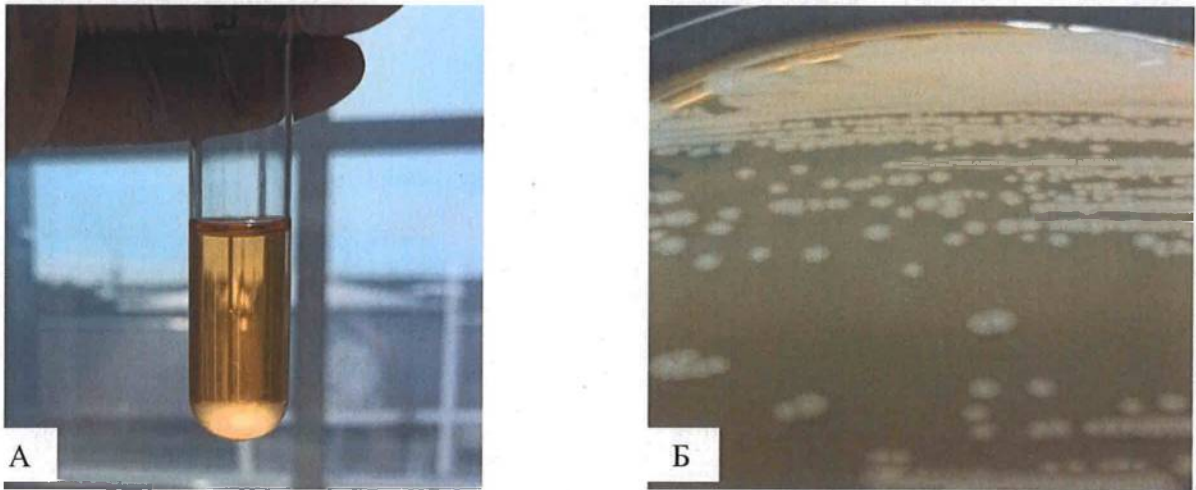


Рисунок 5. Рост *B. anthracis* в МПБ (А) и на плотной питательной среде (Б)

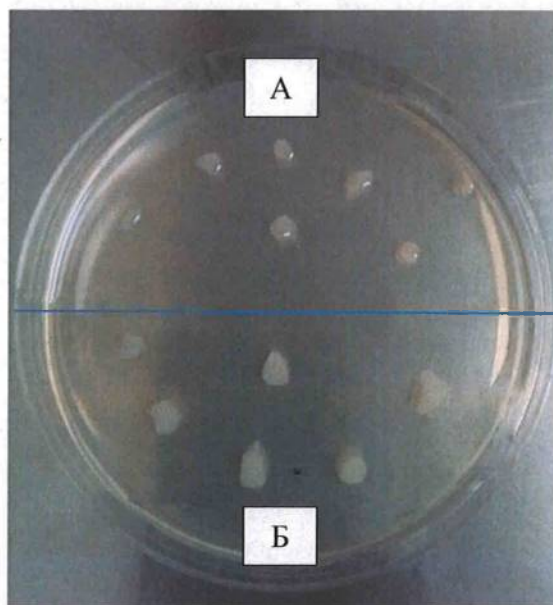


Рисунок 6. Рост на 1 % бикарбонатно-сывороточном агаре в атмосфере с 10 % CO_2 .
Примечание: А – колонии типичного вирулентного капсулообразующего штамма *B. anthracis* в SM-форме; Б – колонии бескапсульного авирулентного штамма *B. anthracis* в RS-форме

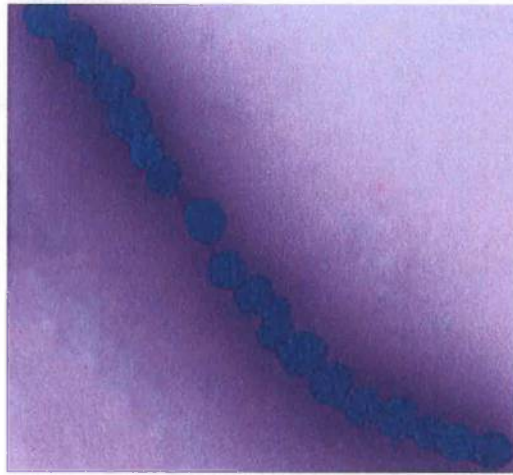
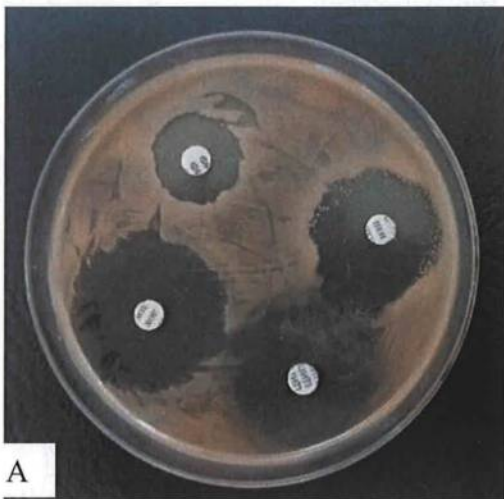
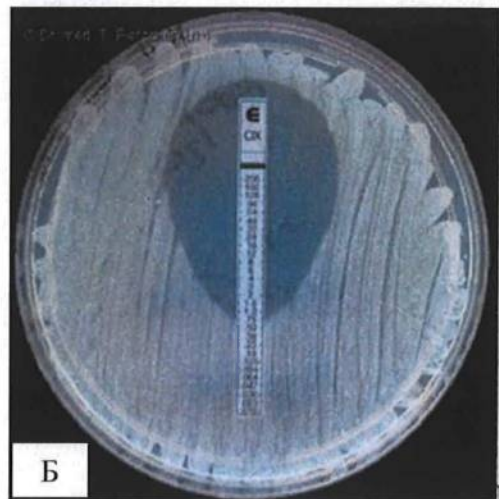


Рисунок 7. Тест «жемчужного ожерелья» – окраска по Ребигеру



А



Б

Рисунок 8. Определение чувствительности к антибиотикам диско-диффузионным методом (А) и методом E-тестов (Б)



Рисунок 9. Лизис культуры *B. anthracis* сибиреязвенным бактериофагом «Гамма А-26»

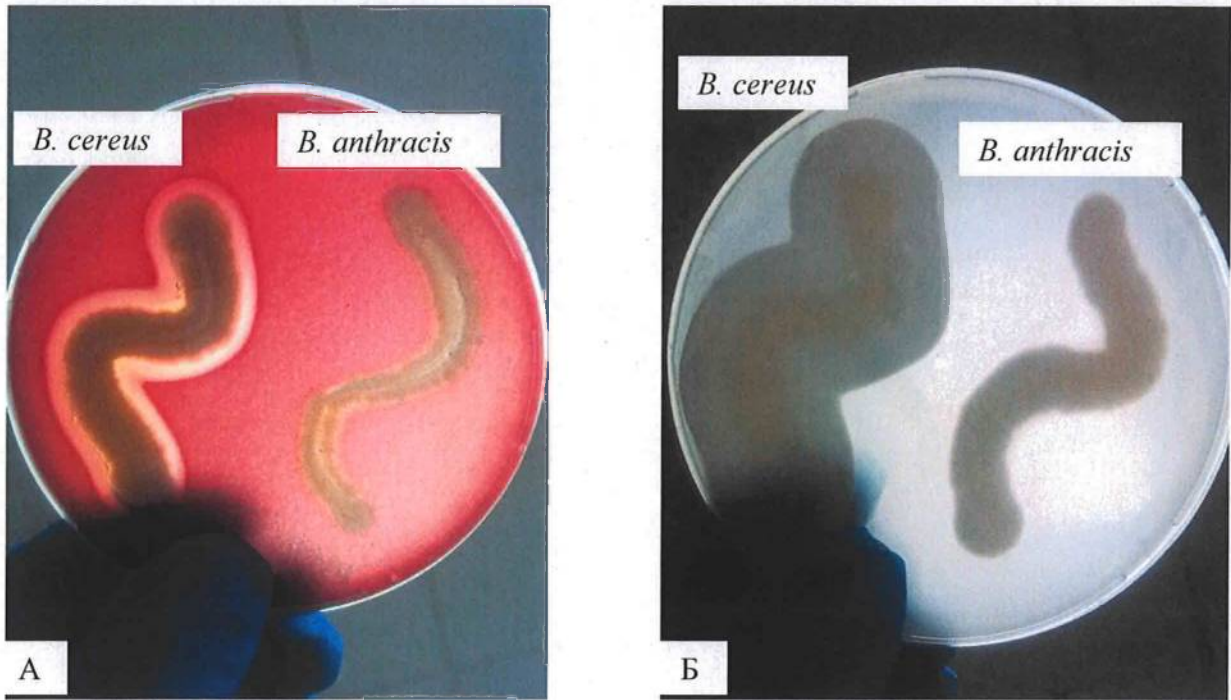


Рисунок 10. Тест на гемолиз (А) и лецитиназу (Б)

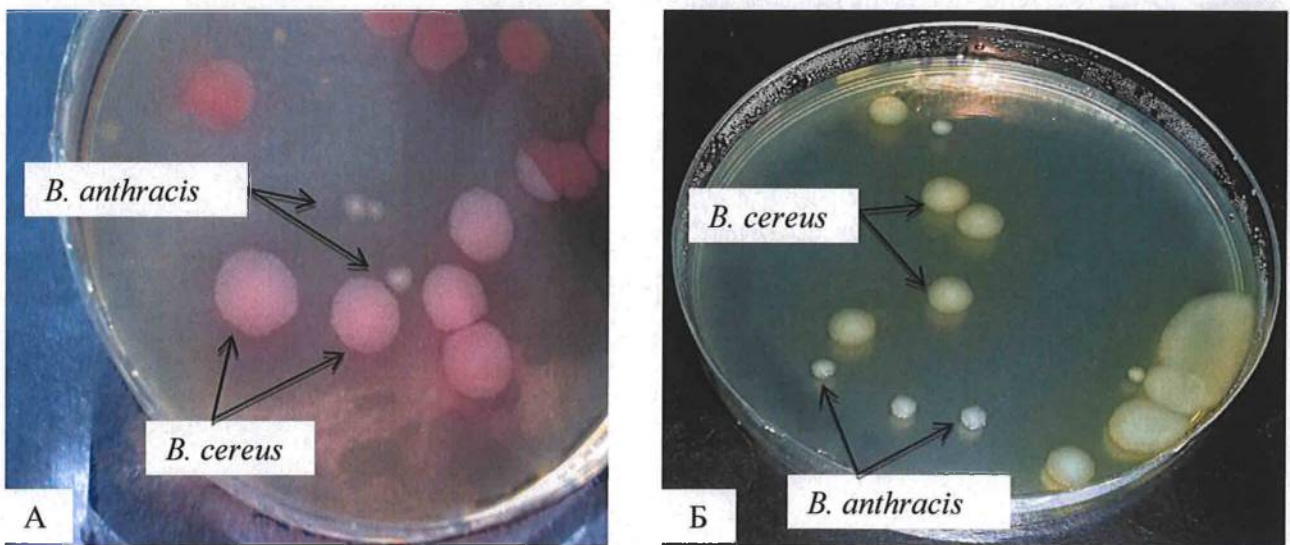


Рисунок 11. Тест на щелочную фосфатазу на селективной дифференциально-диагностической среде с 0,01 % фенолфталеинфосфатом натрия (А) и 0,05 % динатриевой солью паранитрофенилфосфата (Б)

**Критерии интерпретации результатов исследования чувствительности
B. anthracis к антибактериальным средствам:
пограничные значения диаметров зон подавления роста (мм)
и величин минимальной подавляющей концентрации (мг/л)
антибактериальных препаратов**

Антибактериальный препарат	Содержание препарата в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста, мм		Значение МПК, мг/л	
		S*	R*	S*	R*
Бензилпенициллин	10	≥ 26	≤ 16	≤ 0,1	≥ 1,0
Ампициллин	10	≥ 27	≤ 16	≤ 0,1	≥ 1,0
Цефазолин	30	≥ 29	≤ 16	≤ 0,2	≥ 1,0
Цефалексин	30	≥ 29	≤ 16	≤ 1,0	≥ 4,0
Эритромицин	15	≥ 24	≤ 16	≤ 1,0	≥ 4,0
Азитромицин	30	≥ 24	≤ 16	≤ 1,0	≥ 4,0
Линкомицин	15	≥ 23	≤ 16	≤ 1,0	≥ 4,0
Канамицин	10	≥ 19	≤ 16	≤ 1,0	≥ 4,0
Гентамицин	10	≥ 23	≤ 16	≤ 1,0	≥ 4,0
Стрептомицин	10	≥ 18	≤ 16	≤ 1,0	≥ 4,0
Амикацин	30	≥ 23	≤ 16	≤ 1,0	≥ 4,0
Тетрациклин	30	≥ 23	≤ 16	< 0,1	≥ 1,0
Доксициклин	10	≥ 23	≤ 16	< 0,1	≥ 1,0
Рифампицин	5	≥ 20	≤ 13	≤ 0,1	≥ 1,0
Ципрофлоксацин	5	≥ 17	≤ 15	< 0,1	≥ 1,0
Офлоксацин	5	≥ 19	≤ 15	< 0,1	≥ 1,0
Пефлоксацин	10	≥ 19	≤ 15	< 0,1	≥ 1,0
Ломефлоксацин	10	≥ 20	≤ 15	< 0,1	≥ 1,0
Меропенем	10	≥ 26	≤ 15	< 0,1	≥ 1,0
Имипенем	–	–	–	< 0,1	≥ 1,0

Временной график выполнения лабораторных исследований на сибирскую язву

1-й день

1. Подготовка материала для исследования.
2. ПЦР.
3. МФА.
4. Иммунологические исследования (например, реакция преципитации по Асколи, РНГА, ИФА, нМФА, аллерготест *in vitro*).
5. Посев материала на питательные среды.
6. Заражение биопробных животных.

2-й день

При наличии роста на питательных средах:

1. оценка характера роста на плотных питательных средах и отбор колоний для пересева, микроскопия мазков из культур;
2. рассев отобранных культур с питательных сред до отдельных колоний на плотных неселективных питательных средах;
3. ПЦР с материалом из колоний;
4. МФА с материалом из колоний.

При наличии чистых культур по результатам ПЦР, микроскопии и МФА:

1. отсев чистых культур из изолированных колоний на плотные неселективные и жидкие питательные среды;
2. постановка с материалом из чистых культур опорных идентификационных тестов (капсулообразование, на чувствительность к пенициллину, с бактериофагом, на щелочную фосфатазу, на гемолиз).
3. Наблюдение за биопробными животными, вскрытие павших, высевы на питательные среды и мазки-отпечатки из органов;
4. Микроскопия мазков от биопробных животных.

3-й день

1. Учет результатов опорных идентификационных тестов с чистой культурой.
2. Постановка остальных основных и дополнительных идентификационных тестов с чистой культурой.
3. Наблюдение за биопробными животными, вскрытие павших, высевы на питательные среды и мазки-отпечатки из органов.
4. Микроскопия мазков от биопробных животных; оценка характера роста посевов из органов биопроб на плотных питательных средах; отбор колоний для пересева, микроскопия мазков из культур, отсев чистых культур из изолированных колоний на плотные неселективные и жидкие питательные среды, постановка ПЦР, МФА с культурами, постановка идентификационных тестов с чистой культурой).

5. При наличии чистой культуры и отсутствии павших животных – заражение дополнительных биопробных животных материалом из бульонной или агаровой культуры.

6. При появлении роста на питательных средах, выделении чистой культуры – проведение исследований 2 дня.

4-10-й день

1. Учет результатов опорных и дополнительных идентификационных тестов с чистой культурой.

2. Проведение исследований 2 – 3 дней в зависимости от роста на питательных средах и результатов биопроб.

Нормативные и методические документы

1. Федеральный закон от 30.03.1999 № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».
2. Федеральный закон от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации».
3. Федеральный закон от 30.12.2020 № 492-ФЗ «О биологической безопасности в Российской Федерации».
4. Федеральный закон от 17.09.1998 № 157-ФЗ «Об иммунопрофилактике инфекционных болезней».
5. Закон Российской Федерации от 14.05.1993 № 4979-1 «О ветеринарии».
6. Постановление Правительства Российской Федерации от 25.01.2022 № 46 «О лицензировании деятельности в области использования возбудителей инфекционных заболеваний человека и животных (за исключением случая, если указанная деятельность осуществляется в медицинских целях) и генно-инженерно-модифицированных организмов III и IV степеней потенциальной опасности, осуществляемой в замкнутых системах».
7. СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».
8. Приказ Роспотребнадзора от 01.12.2017 № 1116 «О совершенствовании системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации».
9. Приказ Роспотребнадзора от 20.02.2020 № 107 «О мониторинге эпидемиологических рисков в зарубежных странах и предоставлении информации».
10. Приказ Росстата от 30.12.2020 № 867 «Об утверждении форм федерального статистического наблюдения с указаниями по их заполнению для организации Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека федерального статистического наблюдения за санитарным состоянием субъекта Российской Федерации».
11. Приказ Минздрава России от 06.12.2021 № 1122н «Об утверждении национального календаря профилактических прививок, календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям и порядка проведения профилактических прививок».
12. Приказ Росстата от 13.12.2024 № 639 «Об утверждении форм федерального статистического наблюдения № 1 и № 2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях» и указаний по их заполнению».
13. Постановление Правительства Российской Федерации от 30.11.2024 № 1684 «Об утверждении Правил государственной регистрации медицинских изделий».
14. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 04.02.2016 № 11 «О предоставлении внеочередных донесений о чрезвычайных ситуациях санитарно-эпидемиологического характера».
15. Постановление Главного государственного санитарного врача

Российской Федерации от 12.12.2016 № 180 «О дополнительных мероприятиях, направленных на профилактику сибирской язвы в Российской Федерации».

16. Положение об эпидемиологическом мониторинге за инфекционными и паразитарными болезнями.

17. Ветеринарные правила осуществления профилактических, диагностических, лечебных, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов сибирской язвы.

18. МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I – IV групп патогенности».

19. МУ 3.4.3008-12 «Порядок эпидемиологической и лабораторной диагностики особо опасных, «новых» и «возвращающихся» инфекционных болезней».

20. МУ 4.2.2039-05 «Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Техника сбора и транспортировки биоматериалов в микробиологические лаборатории».

21. МУК 4.2.3733-21 «Подготовка культур микроорганизмов I – II групп патогенности для анализа методом MALDI-TOF масс-спектрометрии и формирование баз данных референсных масс-спектров для автоматической идентификации микроорганизмов».

22. МР 3.1.0322-23 «Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих в природных очагах инфекционных болезней».

23. МР 3.1.0232-21 «Определение эпидемиологической опасности почвенных очагов сибирской язвы».

24. ГОСТ 177-88 «Водорода перекись. Технические условия».

25. ГОСТ Р ИСО 5725-2-2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений».

Библиографические ссылки

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Ленинград. Медгиз. 1962. С. 82 – 144.
2. Донков С.А. Применение формул электронных таблиц MS Excel для обработки данных при изучении патогенных свойств микроорганизмов. Актуальные вопросы ветеринарной медицины, 2005. С. 127 – 129.
3. Маринин Л.И., Дятлов И.А., Мокриевич А.Н. и др. Методы изучения биологических и молекулярно-генетических свойств возбудителя сибирской язвы. Учебно-методическое пособие. Под редакцией И.А. Дятлова. Москва. Издательство «Династия». 2021. 240 с.
4. Маринин Л.И., Дятлов И.А., Шишкова Н.А., Фирстова В.В. Сибирская язва вчера и сегодня. Москва. Издательство «Династия». 2021. 648 с.
5. Медицинская микробиология. Клинически значимые микроорганизмы с позиции современной таксономии. Том 1. Прокариоты. Домен Археи. Домен Бактерии (Царство Гидробактерии). Под редакцией А.Л. Гинцбурга, Т.В. Припутневич, И.О. Стомы. Москва. Наука. 2025. 515 с.
6. Сибирская язва: актуальные проблемы разработки и внедрения медицинских средств защиты. Под редакцией Г.Г. Онищенко, И.В. Дармова, С.В. Борисевича. 2-е издание, исправленное и дополненное. Санкт-Петербург. 2018. 592 с.
7. Справочник Берджи по бактериологической систематике (англ. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Ed., 2015).
8. Опыт ликвидации вспышки сибирской язвы на Ямале в 2016 году. Под редакцией А.Ю. Поповой, А.Н. Куличенко. Ижевск. ООО «Принт-2». 2017. 313 с.
9. Черкасский Б.Л. Эпидемиология и профилактика сибирской язвы. Москва. «ИНТЕРСЭН». 2002. 384 с.
10. Черкасский Б.Л. Сибирская язва как биологическое оружие. Москва. «ИнтерСЭН». 2002. 40 с.
11. Beyer W., et al. Distribution and Molecular Evolution of *Bacillus anthracis* Genotypes in Namibia. PLoS Negl Trop Dis. 2012. 6(3):e1534.
12. Fayad N., et al. Diversity of *Bacillus cereus sensu lato* mobilome. BMC Genomics. 2019. 20(1):436.
13. Kenefic L.J., et al. High resolution genotyping of *Bacillus anthracis* outbreak strains using four highly mutable single nucleotide repeat markers. Letters in Applied Microbiology. 2008. 46:600 – 603.
14. Lista F., et al. Genotyping of *Bacillus anthracis* strains based on automated capillary 25-loci Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeats Analysis. BMC Microbiol. 2006. 6(33).
15. Pilo P., Frey J. Pathogenicity, population genetics and dissemination of *Bacillus anthracis*. Infect. Genet. and Evol. 2018. № 64. P. 115-125.
16. Thierry S., et al. Genotyping of French *Bacillus anthracis* strains based on 31-loci multi locus VNTR analysis: epidemiology, marker evaluation, and update of the internet genotype database. PLoS One. 2014. 9(6):e95131.
17. Van Ert M.N., et al. Global Genetic Population Structure of *Bacillus anthracis*. PLoS One. 2007. 2(5): e461.