

# Учебные штаммы бруцелл для профессиональной переподготовки бактериологов, эпидемиологов и лаборантов

Т.П.Шмелькова, Т.А.Малюкова, Г.В.Чеховская, Н.А.Осина, В.Г.Германчук, Ю.А.Попов

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

Сформирован учебный набор из 7 штаммов бруцелл, обеспечивающий изучение регламентированных методов лабораторной диагностики бруцеллеза при профессиональной переподготовке бактериологов, эпидемиологов, лаборантов для работ с возбудителями особо опасных инфекций. Применение набора обусловило расширение спектра профессиональных умений и навыков, приобретаемых слушателями курсов, а также снижение риска лабораторного инфицирования на практических занятиях. Базовыми принципами снижения биорисков являются использование вакцинного штамма *Brucella abortus* 19 BA обучающимися при освоении лабораторных методов диагностики, а также подготовка культур других штаммов преподавателями, допущенными к работе с патогенными биологическими агентами I–II групп, для демонстрации диагностически значимых биологических свойств бруцелл, отличных от вакцинного штамма.

**Ключевые слова:** бруцеллез, профессиональная переподготовка, учебный набор штаммов, остаточная вирулентность, диагностически значимые признаки

**Для цитирования:** Шмелькова Т.П., Малюкова Т.А., Чеховская Г.В., Осина Н.А., Германчук В.Г., Попов Ю.А. Учебные штаммы бруцелл для профессиональной переподготовки бактериологов, эпидемиологов и лаборантов. Бактериология. 2023; 8(2): 49–55. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-2-49-55

## Practice strains of brucella for professional retraining of bacteriologists, epidemiologists and laboratory assistants

T.P.Shmelkova, T.A.Malyukova, G.V.Chekhovskaya, N.A.Osina, V.G.Germanchuk, Yu.A.Popov

Russian Anti-Plague Institute «Microbe» of the Rosпотребнадзор, Saratov, Russian Federation

A training set of 7 brucella strains has been formed, which provides the study of regulated methods of laboratory diagnosis of brucellosis during professional retraining of bacteriologists, epidemiologists, laboratory assistants for work with pathogens of particularly dangerous infections. The use of the kit results in expansion of the range of professional skills acquired by retrainees, as well as a reduction in the risk of laboratory infection in practical classes. The basic principles of reducing biorisks are the use of the *Brucella abortus* 19 BA vaccine strain when mastering laboratory diagnostic methods, as well as the preparation of cultures of other strains by tutors admitted to work with PBAs groups I–II to demonstrate diagnostically significant biological properties of brucella that are different from the vaccine strain.

**Key words:** brucellosis, professional retraining, training set of strains, residual virulence, diagnostically significant features

**For citation:** Shmelkova T.P., Malyukova T.A., Chekhovskaya G.V., Osina N.A., Germanchuk V.G., Popov Yu.A. Practice strains of brucella for professional retraining of bacteriologists, epidemiologists and laboratory assistants. Bacteriology. 2023; 8(2): 49–55. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-2-49-55

**Б**руцеллез входит в группу самых распространенных зооантропонозных инфекционных болезней, поражающих сельскохозяйственных животных и людей, и характеризуется высокими показателями социально-экономического ущерба [1, 2].

В мероприятия по лабораторной диагностике бруцеллеза вовлечен большой круг специалистов организаций и учреж-

дений Роспотребнадзора, Минздрава, Минсельхоза, для которых обязательным требованием при допуске к работе является профессиональная переподготовка с освоением правил безопасной работы с патогенами.

Одним из основных учебных модулей программ профессиональной переподготовки бактериологов, эпидемиологов и лаборантов для работ с возбудителями особо опасных ин-

### Для корреспонденции:

Шмелькова Татьяна Петровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела образовательных программ и подготовки специалистов ФКУН «Российского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора

Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46  
Телефон: (904) 240-8143  
E-mail: training@microbe.ru

Статья поступила 26.05.2023, принята к печати 30.06.2023

### For correspondence:

Tatyana P. Shmelkova, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher, Department of Educational Programs and Training of Specialists, Russian Anti-Plague Institute «Microbe», Rosпотребнадзор

Address: 46 Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation  
Телефон: (904) 240-8143  
E-mail: training@microbe.ru

The article was received 26.05.2023, accepted for publication 30.06.2023

фекций является модуль «Микробиология и лабораторная диагностика бруцеллеза», дающий возможность приобрести профессиональные теоретические знания, практические умения и навыки выполнения регламентированных методов индикации и идентификации бруцелл.

Традиционно в качестве базового штамма при проведении практических занятий используют вакцинный штамм *Brucella abortus* 19 VA, который, наряду с явными преимуществами (в первую очередь низкий показатель вирулентности), не может перекрыть весь спектр значимых для диагностики биологических свойств патогенных для человека бруцелл видов *B. melitensis*, *B. suis* и других, что определяет необходимость создания учебного набора штаммов. Однако при совершенствовании учебного процесса следует учитывать один из принципов обеспечения биобезопасности практических занятий – исключение или сокращение использования патогенных микроорганизмов путем замены вирулентных штаммов на менее вирулентные, в т.ч. вакцинные или авирулентные [3].

**Цель работы:** сформировать учебный набор штаммов возбудителей бруцеллеза, содержащий преимущественно авирулентные штаммы, позволяющие снизить риск инфицирования слушателей курсов при самостоятельной работе на практических занятиях и освоить свойства, базовые для лабораторной диагностики бруцеллеза регламентированными методами индикации и идентификации.

## Материалы и методы

При формировании требований к штаммам учебного набора руководствовались законодательными и подзаконными актами Российской Федерации, нормативными и методическими документами по лабораторной диагностике бруцеллеза и биобезопасности при работе с патогенами; программами профессиональной переподготовки специалистов по особо опасным инфекциям [4–8]. С учетом сформулированных нами критериев на основании паспортных данных проводили отбор штаммов *Brucella ssp.* из числа депонированных в Государственной коллекции патогенных бактерий (ГКПБ) на базе ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб».

**Методы исследования:** аналитический; культурально-морфологический, биохимические, иммунологические, биологический, молекулярно-генетический, регламентированные при лабораторной диагностике бруцеллеза.

Культуры микроорганизмов выращивали на бруцелла-бульоне и бруцеллагаре (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), pH 6,9, в течение 48 ч. Для восстановления биологических свойств после хранения культуры прошли пассирование через организм чувствительных животных – белых мышей (анимализацию) – с последующим отбором типичных колоний, выросших на плотной питательной среде из посевов печени, селезенки и крови.

Вирулентность исследуемых штаммов определяли по величине инфицирующей дозы (ИД<sub>50</sub>) для беспородных белых мышей и морских свинок.

При определении инфицирующей дозы для белых мышей (18–20 г) взвеси двухсуточных агаровых культур бруцелл второго пассажа в концентрациях  $2 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^4$ ,

$2 \times 10^3$ ,  $2 \times 10^2$  м.к./мл вводили подкожно во внутреннюю поверхность бедра в объеме 0,5 мл. Каждым разведением заражали группу из 6 животных. Через 14 суток проводили гуманную эвтаназию и срезом селезенки делали высевы отпечатком на бруцеллагар. Посевы инкубировали 4–6 суток, отмечая наличие или отсутствие роста колоний бруцелл.

Расчет вели по формуле:

$$\lg \text{ИД}_{50} = \lg D - \lg n(\sum Z_i - 0,5), \quad (1)$$

где  $\lg \text{ИД}_{50}$  – логарифм инфицирующей дозы;

$\lg D$  – логарифм максимальной из испытанных доз;

$\lg n$  – логарифм шага разведения бактериальной взвеси;

$Z_i$  – отношение числа животных с положительным высевом из селезенки к числу зараженных животных;

$\sum Z_i$  – сумма значений  $Z_i$ .

При определении инфицирующей дозы для морских свинок (320–380 г) взвеси двухсуточных агаровых культур второго пассажа в концентрации  $2 \times 10^9$  м.к./мл вводили подкожно во внутреннюю поверхность бедра в объеме 1,0 мл. Одним штаммом заражали группу из 3 животных. Через 14 суток проводили гуманную эвтаназию, селезенки морских свинок каждой группы (3 шт.) объединяли, растирали в ступке, добавляя 3 мл физиологического раствора, и титровали до концентраций 1/10, 1/100 и 1/1000. Цельную суспензию и ее десятикратные разведения высевали по 0,1 мл на 2 пластинки бруцеллагара. После 4–5 суток инкубации проводили подсчет типичных колоний возбудителей бруцеллеза.

Количество бактерий в 1 мл цельной суспензии селезенки морских свинок каждой исследуемой группы рассчитывали по формуле:

$$n = p \times 10 \times d_r, \quad (2)$$

где  $n$  – количество бактерий в 1 мл цельной суспензии селезенки,

$p$  – количество типичных колоний на агаровой пластинке,

$d_r$  – коэффициент разведения суспензии: 1 (цельная), 10 (разведение 1/10), 100 (разведение 1/100) и 1000 (разведение 1/1000).

Определяли среднее арифметическое количество бруцелл по каждому разведению.

Морфологию клеток изучали в мазках, окрашенных по Граму, с использованием светового микроскопа «Микмед-5» («ЛОМО», Санкт-Петербург), увеличение  $\times 1000$ , масляная иммерсия. Морфологию колоний оценивали визуально и под малым увеличением светового микроскопа.

Выявление родоспецифических антигенов осуществляли методом флуоресцирующих антител (МФА) с иммуноглобулинами диагностическими флуоресцирующими бруцеллезными сухими (ФКУЗ «Ставропольский НИПЧИ») и в реакции агглютинации (РА) с сывороткой бруцеллезной диагностической поливалентной сухой (ФКУЗ «Иркутский НИПЧИ») в соответствии с инструкцией. Использованные медицинские изделия для *in vitro* диагностики прошли государственную регистрацию на территории Российской Федерации. Просмотр МФА-мазков осуществляли посредством флуоресцентного микроскопа Eclірse 80i (Nicon, Япония), увеличение  $\times 1000$ , масляная иммерсия.

Изменчивость бруцелл (S-R диссоциация) определяли в пробе Уайт–Вильсона.

Межвидовую дифференциацию проводили по отношению к избыточному содержанию CO<sub>2</sub> при культивировании первой генерации бруцелл, способности к образованию сероводорода, редуцирующей активности в отношении анилиновых красителей фуксина и тионина, уреазной активности, а также по наличию родоспецифичного гена *bcs31* и отсутствию одного из видоспецифичных генов *BRA0420* (*B. abortus*), *BRA0907* (*B. melitensis*), *BME11426* (*B. canis*), *BME110711* (*B. neotomae*), *BME10994* (*B. ovis*). Для проведения молекулярно-генетического анализа использовали «Набор реагентов для выявления и дифференциации штаммов возбудителя бруцеллеза методом полимеразной цепной реакции с учетом результатов в режиме реального времени «Бру-Диф-РГФ» (ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора), имеющий государственную регистрацию.

При постановке биопробы изучена способность исследуемых штаммов бруцелл распространяться в тканях и органах чувствительного макроорганизма (кровь, перитонеальный экссудат, лимфатические узлы, селезенка и печень).

### Результаты исследования и их обсуждение

Штаммы рода *Brucella*, используемые для обеспечения практических занятий, должны быть максимально безопасными и обладать набором свойств, необходимых для индикации, идентификации и межвидовой дифференциации. В соответствии с нормативными и методическими документами по лабораторной диагностике бруцеллеза, учебными планами программ профессиональной переподготовки специалистов, действующими санитарными правилами и нормами по обеспечению биологической безопасности работ с патогенными биологическими агентами (ПБА) нами были составлены технические задания на штаммы рода *Brucella* с перечнем таксономических признаков (НМД по лаб. диагностике и СанПиН 3.3686-21). Было определено, что используемые в учебном наборе бруцеллы должны соответствовать следующим требованиям:

- авирулентность или сниженная вирулентность штаммов, выдаваемых слушателям курсов для проведения микробиологических манипуляций на практических занятиях. Показатель вирулентности возбудителя бруцеллеза – ИД<sub>50</sub> – должна быть сопоставима с ИД<sub>50</sub> вакцинного штамма *B. abortus* 19 ВА: для белых мышей – от  $5,0 \times 10^2$  до  $5,0 \times 10^5$  м.к., для морских свинок – от  $5,0 \times 10^2$  до  $5,0 \times 10^4$  м.к. [9];

- наличие комплекса свойств, позволяющих изучить типичные морфологические, культуральные и физиолого-биохимические характеристики рода и видов бруцелл, провести индикацию и идентификацию регламентированными методами;

- наличие родоспецифических антигенов, выявляемых с помощью регламентированных иммунологических методов – МФА, РА;

- наличие комплекса свойств, позволяющих провести межвидовую дифференциацию бруцелл, включая потребность в присутствии 5–10% CO<sub>2</sub> при культивировании первой генерации штамма; интенсивность образования сероводорода; уреазную активность; редуцирующую активность в отношении анилиновых красителей (тионина, фуксина);

- наличие родоспецифичного гена *bcs31* и отсутствие одного из видоспецифичных генов *BRA0420* (*B. abortus*), *BRA0907* (*B. melitensis*), *BME11426* (*B. canis*), *BME110711* (*B. neotomae*), *BME10994* (*B. ovis*), детекция которых осуществляется с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР);

- способность моделировать экспериментальную инфекцию у лабораторных животных и стабильно выделяться из паренхиматозных органов при посеве на плотные питательные среды.

Работу проводили поэтапно: 1) первичный отбор штаммов из фонда ГКПБ на основе паспортных данных; 2) оценка штаммов по вирулентности и диагностически значимым биологическим свойствам; 3) формирование учебного набора бруцелл и разработка рекомендаций по их использованию в образовательном процессе.

В результате анализа паспортных данных в соответствии с разработанными критериями нами были отобраны 9 штаммов: *B. melitensis* 16М; *B. abortus* C-68, *B. abortus* 544, *B. abortus* 19 ВА; *B. suis* 40, *B. suis* 1330; *B. neotomae* 5K33; *B. ovis* 25-90; *B. canis* 1066.

Первоначально все штаммы – кандидаты в учебные были оценены по одному из основных критериев – вирулентности для белых мышей и морских свинок (табл. 1). Инфицирующая доза всех изученных штаммов, кроме *B. melitensis* 16М на мышах и морских свинках, а также *B. suis* 1330 на морских свинках, находилась в пределах, установленных для вакцинного [ФС.3.3.1.0011.15].

Отобранные штаммы были охарактеризованы с помощью регламентированных диагностических тестов (табл. 1).

Анализ полученных результатов позволил сделать следующий выбор для проведения практических занятий учебного модуля «Микробиология и лабораторная диагностика бруцеллеза»:

1) изучение морфологических и культуральных свойств возбудителей бруцеллеза – *B. abortus* 19 ВА, *B. melitensis* М-16, *B. ovis* 25-90 и *B. neotomae* 5K33. Для изучения морфологии клеток возбудителей бруцеллеза на практических занятиях используют вакцинный штамм *B. abortus* 19 ВА, обладающий тинкториальными (окраска по Граму) и морфологическими характеристиками клетки, типичными для всех представителей рода *Brucella*. Кроме того, важной характеристикой вида бруцелл является оценка культуральных свойств. Характерными признаками роста возбудителей бруцеллеза на питательной среде являются медленный рост в S- или R-формах. Использование штамма *B. abortus* 19 ВА позволяет изучить морфологию S-формы роста бруцелл, характеризующуюся формированием на агаре бесцветных, диаметром 0,5–2 мм, гомогенных, выпуклых колоний с гладкой поверхностью и ровным краем, а в бульоне – гомогенным помутнением.

Использование штамма *B. melitensis* 16 М позволяет изучить особенности роста наиболее вирулентного для человека вида бруцелл, колонии которого растут в S-форме, но отличаются очень небольшим (диаметр 0,1–0,3 мм) размером, в 5 и более раз меньше колоний *B. abortus* 19 ВА.

Штаммы *B. ovis* 25-90 и *B. neotomae* 5K33 позволяют изучить морфологию R-формы роста бруцелл, характеризующуюся формированием на агаре мутных колоний с зерни-

Таблица 1. Диагностически значимые свойства штаммов бруцелл – кандидатов в учебные  
 Table 1. Diagnostically significant properties of Brucella strains – candidates for training

Наименование / Name		ИД50, м.к. / ID50, mc		Тинкториальные свойства / Tinctorial properties	Рост на питательной среде / Growth on the nutrient medium		проба Уайт–Вильсона / White–Wilson test	РА с поливалентной сывороткой / RA with polyvalent serum	МФА / DFA (Direct fluorescent antibody)
вид / variety	штамм / strain	белые мыши / white mice	морские свинки / Guinea pigs		на плотной (размер колоний, мм) / on the dense (colony size, mm)	в жидкой / in the liquid			
<i>B. melitensis</i>	16M	9,7	2,7 × 10 <sup>6</sup>	Грам- / Gram-	0,1–0,3	бульон полупрозрачный (легкое равномерное помутнение), пристеночное кольцо, осадок / translucent broth (slight uniform turbidity), parietal ring, sediment	неокрашенные / S-форма / unpainted / S-shape	+++	нет данных / no data
<i>B. abortus</i>	19 BA	1,4 × 10 <sup>4</sup>	4,0 × 10 <sup>3</sup>	-«-	0,2–0,3	равномерное помутнение, пристеночное кольцо, осадок / uniform turbidity, parietal ring, sediment	-«-	+++	++++
	C-68	3,0 × 10 <sup>3</sup>	4,0 × 10 <sup>3</sup>	-«-	0,2–0,3	небольшие фрагменты кольца, прозрачный бульон, плохо разбивающийся осадок / small fragments of the ring, clear broth, hard to break sediment	-«-	++++	+++
	544	1,0 × 10 <sup>5</sup>	5,9 × 10 <sup>3</sup>	-«-	0,1–0,2	равномерное помутнение, пристеночное кольцо, плохо разбивающийся осадок / uniform turbidity, parietal ring, poorly breaking sediment	-«-	++++	нет данных / no data
<i>B. suis</i>	40	1,1 × 10 <sup>3</sup>	1,9 × 10 <sup>4</sup>	-«-	0,1–0,2	прозрачный бульон, осадок / clear broth, sediment	-«-	++	+++
	1330	9,1 × 10 <sup>4</sup>	5,9 × 10 <sup>4</sup>	-«-	0,2–0,3	равномерное помутнение, пристеночное кольцо, осадок, плохо разбивающиеся тяжи / uniform turbidity, parietal ring, sediment, poorly broken strands	-«-	++++	++++
<i>B. neotomae</i>	5K33	3,4 × 10 <sup>4</sup>	2,6 × 10 <sup>3</sup>	-«-	0,2–0,9	прозрачный бульон, плохо разбивающийся осадок / clear broth, hard to break sediment	Около 70% колоний синего цвета / R-форма / R-forma About 70% of the colonies are blue / R-shape	+++	++++
<i>B. ovis</i>	25–90	1,3 × 10 <sup>5</sup>	нет данных / no data	-«-	0,1–0,3	нет данных / no data	R-форма / R-forma	нет данных / no data	нет данных / no data
<i>B. canis</i>	1066	4,0 × 10 <sup>5</sup>	нет данных / no data	-«-	0,2–0,3	нет данных / no data	нет данных / no data	нет данных / no data	нет данных / no data

стой или слизистой поверхностью, неровным краем, а в бульоне – появлением хлопьев и осадка на фоне прозрачной среды;

2) иммунологические методы в схеме лабораторной диагностики бруцеллеза (МФА, РА) – *B. abortus* 19 BA, *B. suis* 1330, *B. neotomae* 5K33.

Вследствие трудностей, связанных с выделением культуры бруцелл и длительностью культивирования возбудителей,

иммунологические методы занимают одно из ведущих мест в комплексе основных методов индикации. Широко используют МФА и РА.

Результаты МФА со штамма *B. abortus* 19 BA, *B. suis* 1330 и *B. neotomae* 5K33 оценивают как специфическое свечение с яркостью 4 креста – яркая флуоресценция желто-зеленого цвета оболочки микробной клетки, четко контрастируемая с темным телом клетки.

Таблица. 2. Межвидовая дифференциация штаммов бруцелл – кандидатов в учебные  
Table. 2. Interspecific differentiation of *Brucella* strains – candidates for training

Наименование / Name вид / variety	штамм / strain	Культивирование первой генерации / Cultivation of the first generation		Образование H <sub>2</sub> S, мм / H <sub>2</sub> S formation, mm	Редукция анилиновых красителей / Reduction of aniline dyes		Уреазная активность / Urease activity
		доступ воздуха / air access	избыток CO <sub>2</sub> / excess CO <sub>2</sub>		фуксин / magenta	тионин / thionine	
<i>B. melitensis</i>	16M	+	+	-	+	+	в течение 1 ч / during 1 hour
<i>B. abortus</i>	19 BA	-	+	6	+	-	-«-
	C-68	+	+	5	+	+	-«-
	544	+	+	-	+	-	-
<i>B. suis</i>	40	+	+	-	+	+	в течение 5 мин / during 5 minutes
	1330	+	+	14	-	+	-«-
<i>B. neotomae</i>	5k33	+	+	-	-	-	+

При постановке РА с препаратом «Сыворотка диагностическая поливалентная бруцеллезная сухая для реакции агглютинации» штаммы *B. abortus* C 68, *B. abortus* 544, *B. suis* 1330 демонстрируют результат, оцениваемый как 4+ – через 2–3 мин формируются крупные или мелкие хлопья на фоне прозрачной среды; штаммы *B. melitensis* 16 M, *B. abortus* 19 BA, *B. neotomae* 5K33 – результат, оцениваемый как 3+: через 2–3 мин формируются крупные или мелкие хлопья на фоне не полностью просветлевшей среды. Данные результаты являются положительными и свидетельствуют о принадлежности штаммов к роду *Brucella*;

3) изучение диссоциации бруцелл – *B. abortus* 19 BA, *B. ovis* 25-90, *B. neotomae* 5K33.

Для проведения идентификации и межвидовой дифференциации бруцелл регламентировано использовать культуру, находящуюся в S-форме. Поэтому первым этапом идентификации является оценка диссоциации выделенной культуры – степени перехода из S- в R-форму роста.

Одна из методик определения степени диссоциации культур – проба Уайт-Вильсона, при постановке которой диссоциированные колонии окрашиваются кристаллическим фиолетовым от темно-фиолетового до светло-синего цвета, а недиссоциированные, находящиеся в S-форме, остаются неокрашенными. Для изучения роста культуры преимущественно в S-форме используют вакцинный штамм *B. abortus* 19 BA, в R-форме – *B. ovis* 25-90, *B. neotomae* 5K33.

Изучение признаков, регламентированных для межвидовой дифференциации бруцелл, позволило определить группу штаммов для обеспечения практических занятий (табл. 2).

4) освоение межвидовой дифференциации бруцелл, наиболее патогенных для человека – *B. abortus* 19 BA, *B. abortus* C-68, *B. suis* 1330, *B. melitensis* M-16.

Для изучения признаков вида *B. abortus* используют вакцинный штамм *B. abortus* 19 BA биовар 1, обладающий типичными характеристиками: культивирование первой генерации в атмосфере повышенного содержания CO<sub>2</sub> (+), образование сероводорода (+, суммарно 6 мм), рост на среде с тионином (-), с фуксином (+), гидролиз мочевины (уреазная активность) в течение 1 ч после посева.

Для изучения признаков вида *B. suis* используют штамм *B. suis* 1330 биовар 1, обладающий типичными характеристиками: культивирование первой генерации в атмосфере

повышенного содержания CO<sub>2</sub> (-), образования сероводорода (+, суммарно 14 мм), рост на среде с тионином (+), с фуксином (-), гидролиз мочевины (уреазная активность) в течение 5 мин после посева.

Признаки наиболее патогенного вида – *B. melitensis* – демонстрируют на примере штамма *B. melitensis* 16M, обладающего типичными характеристиками: культивирование первой генерации в атмосфере повышенного содержания CO<sub>2</sub> (-), образования сероводорода (-), рост на среде с тионином (+), с фуксином (+), гидролиз мочевины (уреазная активность) в течение 1 ч после посева;

5) для проведения практического занятия «ПЦР в схеме лабораторной диагностики бруцеллеза» целесообразно использовать штаммы 6 видов – *B. abortus* 19 BA, *B. melitensis* 16 M, *B. suis* 1330, *B. ovis* 25-90, *B. canis* 1066, *B. neotomae* 5K33.

В схеме лабораторной диагностики исследование с помощью ПЦР регламентировано как на этапе индикации при исследовании биологического материала и объектов окружающей среды, так и при идентификации выделенных культур и межвидовой дифференциации штаммов *Brucella* ssp.

Нами с помощью набора реагентов «Бру-Диф-РГФ» было исследовано наличие родо- и видоспецифичных генетических маркеров у штаммов бруцелл – кандидатов в учебные. Показано наличие у всех штаммов родоспецифичного фрагмента bcspr31 и соответствующих видоспецифичных генов:

- *B. abortus* 19 BA – BRA0907 (+), BRA0420 (-), BMEI1426 (+), BMEI0711 (+), BMEI0994 (+);

- *B. melitensis* 16 M – BRA0907 (-), BRA0420 (+), BMEI1426 (+), BMEI0711 (+), BMEI0994 (+);

- *B. suis* 1330 – BRA0907 (+), BRA0420 (+), BMEI1426 (+), BMEI0711 (+), BMEI0994 (+);

- *B. ovis* 25-90 – BRA0907 (+), BRA0420 (+), BMEI1426 (+), BMEI0711 (+), BMEI0994 (-);

- *B. canis* 1066 – BRA0907 (+), BRA0420 (+), BMEI1426 (-), BMEI0711 (+), BMEI0994 (+);

- *B. neotomae* 5k33 – BRA0907 (+), BRA0420 (+), BMEI1426 (+), BMEI0711 (-), BMEI0994 (+);

6) освоение биологического метода лабораторной диагностики бруцеллеза в рамках занятия «Лабораторная диагностика бруцеллеза у людей» – *B. abortus* 19 BA, *B. abortus* C-68.

Таблица. 3. Обсемененность органов и тканей белых мышей, инфицированных штаммами бруцелл – кандидатами в учебные  
 Tab. 3. Contamination of organs and tissues of white mice infected with strains of *Brucella* – candidates for training

Наименование / Name		Интенсивность* роста культуры на плотных питательных средах из / Intensity* of culture growth on dense nutrient media from						Морфология колоний, размер / Morphology of colonies, size	Рост в бульоне / growth in broth		
вид / variety	штамм / strain	перитонеальный / peritoneal exsudat / peritoneal	печень / liver	кровь / blood	лимфатические узлы / the lymph nodes	легкие / lungs	селезенка / spleen		печень / liver	селезенка / spleen	кровь / blood
<i>B. melitensis</i>	16M	+++	++	+	+	+	-	колонии бесцветные, выпуклые с гладкой поверхностью, гомогенные, по мере старения культуры становятся белесоватыми, d = 0,5–0,7 мм / colonies are colorless, convex with a smooth surface, homogeneous, as the cultures become whitish as they age, d = 0,5–0,7 mm	+	+	+
<i>B. abortus</i>	19 BA	+	+	-	-	-	+	-«-, d ≈ 0,5 мм, слизистые / ≈ 0.5 mm, mucous	+	+	+
	C-68	+	+++	+++	+	+	+++	-«-	+	+	+
	544	++	+	++	++	++	+	-«-, d = 0,5–0,7 мм	+	+	+
<i>B. suis</i>	40	+	++	+/-	+	+	++	-«-, d = 0,3–0,5 мм	+	+	+
	1330	+	+	+/-	+	+	++	-«-, d ≈ 1,0 мм	+	+	+
<i>B. neotomae</i>	5k33	+	++	+	+	+	+++	-«-, d = 0,7–1,0 мм	+	+	+

\* +++ – очень интенсивный рост; ++ – интенсивный рост; + – единичные колонии.  
 \* +++ - very intensive growth; ++ – intensive growth; + – single colonies.

В схеме лабораторной диагностики бруцеллеза биологический метод является обязательным на этапе индикации с целью накопления бактериальной культуры в органах лабораторных животных и повышения вероятности выделения ее при посеве на питательные среды. Часто бруцеллы можно выделить только с использованием биологического метода.

При заражении вирулентными штаммами бруцелл лабораторные животные заболевают, но не погибают. При вскрытии после эвтаназии отмечают отсутствие каких-либо характерных для бруцеллеза патоморфологических изменений внутренних органов. При посеве фрагментов паренхиматозных органов (печень, селезенка, лимфоузел) и крови на питательные среды выделяют культуру возбудителей бруцеллеза. С целью выбора штаммов бруцелл для проведения практического занятия по освоению биологического метода лабораторной диагностики нами была оценена обсемененность органов и тканей белых мышей, инфицированных исследуемыми штаммами (табл. 3). Обобщение полученных данных позволило предложить использовать для практического занятия два штамма.

Штамм *B. abortus* C-68 применяют преподаватели для демонстрации методики заражения и вскрытия лабораторных животных. При подкожном заражении и последующих посевах на плотные питательные среды отмечено равномерное и интенсивное распространение по органам, особо обильный рост типичных колоний бруцелл наблюдали из отпечатков печени, селезенки и крови.

Однако манипуляции при заражении и вскрытии лабораторных животных относят к процедурам с высоким риском инфицирования, и это определяет целесообразность ис-

пользования обучающимися для проведения работы авирулентного вакцинного штамма *B. abortus* 19 BA, несмотря на рост единичных колоний бруцелл при посеве селезенки, печени и перитонеального экссудата на питательные среды.

Согласно рекомендациям референс-центра по мониторингу за бруцеллезом (ФКУЗ «Ставропольский НИПЧИ» Роспотребнадзора) и для снижения вероятности лабораторного инфицирования обучающихся предложен дифференцированный порядок применения штаммов учебного набора на практических занятиях. Непосредственная работа слушателей курсов профессиональной переподготовки, в т.ч. отработка навыков вскрытия лабораторных животных при освоении биологического метода диагностики, сопряжена с вакцинным штаммом *B. abortus* 19 BA. Подготовку культур *B. abortus* C-68, *B. suis* 1330, *B. melitensis* 16M, *B. neotomae* 5k33, *B. ovis* 25-90, *B. canis* 1066 для демонстрации отличающихся от вакцинного штамма морфологических, культуральных, антигенных свойств, изменчивости (диссоциации S- и R-форм), интенсивности образования сероводорода, редуцирующей активности в отношении анилиновых красителей (фуксина и тионина), уреазной активности, а также подготовку проб – имитаторов ПБА, выделение ДНК и приготовление стандартных учебных образцов для ПЦР-анализа проводят преподаватели, имеющие допуск к работе с ПБА II группы.

При подготовке проб, имитирующих содержимое гигромы (бурсы, абсцесса), шерсть, молоко/молочные продукты, мокроту, почву, воду из открытого водоема, смыв с поверхности, подстилочный материал, фураж, целесообразно наряду с бруцеллами включать «фоновые» микроорганизмы. С этой целью учебный набор дополнен *Escherichia coli* ATCC 25922,

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* 209P (ATCC 6538), *Klebsiella pneumoniae* 8172, *Bacillus cereus* 504-го типа (ATCC 14579).

Таким образом, на основании проведенных исследований сформирован учебный набор штаммов бактерий, который позволяет при профессиональной переподготовке в полном объеме освоить регламентированные методы индикации, идентификации и дифференциации бруцелл, на вакцинном штамме приобрести навыки манипуляций с ПБА II группы с соблюдением правил биобезопасности, снизив вероятность лабораторного инфицирования. Учебный набор в целом или частично может быть применен для обеспечения практических занятий на курсах повышения квалификации.

#### **Информация о финансировании**

*Финансирование данной работы не проводилось.*

#### **Financial support**

*No financial support has been provided for this work.*

#### **Конфликт интересов**

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

#### **Conflict of interests**

*The authors declare that there is no conflict of interest.*

## **Литература**

1. Бруцеллез (руководство для врачей). Под ред. проф. Вершиловой ПА. М., 1961.
2. Пономаренко ДГ, Скударева ОН, Хачатурова АА, Лукашевич ДЕ, Жаринова ИВ, Даурова АВ, и др. Бруцеллез: тенденции развития ситуации в мире и прогноз на 2022 г. в Российской Федерации. Проблемы особо опасных инфекций. 2022;2:36-45. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-2-36-45
3. Основы государственной политики Российской Федерации в области обеспечения химической и биологической безопасности на период до 2025 года и дальнейшую перспективу: Указ Президента Российской Федерации от 11 марта 2019 г. №97.
4. Эпидемиологический надзор и лабораторная диагностика бруцеллеза: методические указания МУК 3.1.7.3402-16.
5. Идентификация и типирование штаммов бруцелл с использованием молекулярно-биологических методов: методические рекомендации МР 3.1.0288-22.
6. Профилактика бруцеллеза: санитарные правила и нормы СанПиН 3.3686-21 (глава XIII).
7. Порядок организации и проведения лабораторной диагностики бруцеллеза для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней: методические указания МУК 4.2.3010-12.
8. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. Под ред. акад. Кутырева ВВ. Изд. 2-е, перераб. и доп. М.: ЗАО Шико, 2013.
9. Вакцина бруцеллезная живая: фармакопейная статья ФС.3.3.1.0011.15.

## **References**

1. Brucellosis (guidelines for doctors). Pod red. prof. Vershilovoi PA. M., 1961. (In Russian).

2. Ponomarenko DG, Skudareva ON, Khachaturova AA, Lukashovich DE, Zharinova IV, Daurova AV, et al. Brucellosis: Trends in the Development of Situation in the World and Forecast for 2022 in the Russian Federation. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2022;2:36-45. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-2-36-45 (In Russian).
3. Osnovy gosudarstvennoi politiki Rossiiskoi Federatsii v oblasti obespecheniya khimicheskoi i biologicheskoi bezopasnosti na period do 2025 goda i dal'neishuyu perspektivu: Ukaz Prezidenta Rossiiskoi Federatsii ot 11 marta 2019 g. №97. (In Russian).
4. Epidemiologicheskii nadzor i laboratornaya diagnostika brutselleza: metodicheskie ukazaniya MUK 3.1.7.3402-16. (In Russian).
5. Identifikatsiya i tipirovanie shtammov brutsell s ispol'zovaniem molekulyarno-biologicheskikh metodov: metodicheskie rekomendatsii MR 3.1.0288-22. (In Russian).
6. Profilaktika brutselleza: sanitarnye pravila i normy SanPiN 3.3686-21 (glava XIII). (In Russian).
7. Poryadok organizatsii i provedeniya laboratornoi diagnostiki brutselleza dlya laboratorii territorial'nogo, regional'nogo i federal'nogo urovnei: metodicheskie ukazaniya MUK 4.2.3010-12. (In Russian).
8. Laboratornaya diagnostika opasnykh infektsionnykh boleznei. Prakticheskoe rukovodstvo. Pod red. akad. Kutyreva VV. Izd. 2-e, pererab. i dop. M.: ZAO Shiko, 2013. (In Russian).
9. Vaksina brutselleznaya zhivaya: farmakopeinaya stat'ya FS.3.3.1.0011.15. (In Russian).

#### **Информация о соавторах:**

Малюкова Татьяна Анатольевна, кандидат медицинских наук, и.о. заведующего отдела образовательных программ и подготовки специалистов ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Чеховская Галина Викторовна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела образовательных программ и подготовки специалистов ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Осина Наталия Александровна, кандидат биологических наук, заведующая отделом микробиологии ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Германчук Валерий Геннадьевич, доктор медицинских наук, заведующий отделом экспериментальных животных с виварием ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

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

#### **Information about co-authors:**

Tatyana A. Malyukova, PhD in Biological Sciences, Acting Head, Department of Educational Programs and Training of Specialists, Russian Anti-Plague Institute «Microbe», Rosпотребнадзор

Galina V. Chekhovskaya, PhD, MD, Senior Researcher, Department of Educational Programs and Training of Specialists, Russian Anti-Plague Institute «Microbe», Rosпотребнадзор

Natalia A. Osina, PhD in Biological Sciences, Head, Department of Microbiology, Russian Anti-Plague Institute «Microbe», Rosпотребнадзор

Valery G. Germanchuk, MD, PhD, DSc, Head, Department of Experimental Animals with a Vivarium, Russian Anti-Plague Institute «Microbe», Rosпотребнадзор

Yury A. Popov, PhD, DSc in Biological Sciences, Chief Researcher, Department of Educational Programs and Specialist Training, Russian Anti-Plague Institute «Microbe», Rosпотребнадзор