

## Современное состояние лабораторной диагностики сибирской язвы: обнаружение и идентификация *Bacillus anthracis*

Л. В. Саяпина<sup>1</sup>, Р. Н. Лобач<sup>2</sup>, В. П. Бондарев<sup>1</sup>, Н. Ф. Никитюк<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерство здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное казенное учреждение «294 Центр спасательных операций особого риска» Министерства чрезвычайных ситуаций Российской Федерации, Москва, Россия

Поступила 14.08.2015. Принята к публикации 17.02.2016.

В статье обобщены материалы источников литературы, посвященные вопросам лабораторной диагностики сибирской язвы. Показана приоритетность разработки новых методов создания высокочувствительных тест-систем и препаратов, предназначенных для обнаружения и идентификации сибиреязвенного микроба. Отмечена роль экспресс-методов для обнаружения возбудителей инфекционных болезней, что имеет большое значение при расследовании актов биотерроризма, спорадических случаев и вспышек среди людей и животных. Приводится анализ использования различных методов выявления возбудителя сибирской язвы, при этом акцентируется внимание на современных молекулярно-диагностических технологиях. Показано, что основными параметрами диагностических тест-систем являются их чувствительность, специфичность, а также воспроизводимость получаемых результатов. В статье приводятся данные о разработках питательных сред для выделения и идентификации возбудителя сибирской язвы, а также о возможности использования сибиреязвенных бактериофагов для фагоиндикации и фагоидентификации бактерий.

**Ключевые слова:** сибирская язва; выявление; идентификация; диагностические препараты; тест-системы; молекулярно-генетические методы.

**Библиографическое описание:** Саяпина ЛВ, Лобач РН, Бондарев ВП, Никитюк НФ. Современное состояние лабораторной диагностики сибирской язвы: обнаружение и идентификация *Bacillus anthracis*. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2016; 16 (1): 27–34.

Сибирская язва — опасное инфекционное заболевание, которое известно с давних времен. При этом, несмотря на своевременные проведения противоэпидемических мероприятий, вспышки сибирской язвы до настоящего времени наблюдаются практически во всех странах мира. Ежегодно регистрируются случаи заболевания не только среди животных, но и людей, в том числе со смертельным исходом. В лабораторной диагностике сибирской язвы важная роль отводится выявлению и идентификации возбудителя в биологическом материале и объектах окружающей среды [1–4].

В настоящее время арсенал методов для обнаружения возбудителей инфекционных заболеваний достаточно широк, начиная от традиционных бактериологических и постановки биопроб на животных до метода флуоресцирующих антител (МФА), реакции непрямой агглютинации (РНГА), иммуноферментного анализа (ИФА), полимеразной цепной реакции (ПЦР) [5–7].

Основными методами выявления сибирской язвы являются МФА и ПЦР [8, 9]. Метод ИФА является доступным и надежным, позволяющим сделать предварительный вывод о наличии возбудителя сибирской язвы в исследуемом материале и своевременно начать проведение противоэпидемических и профилактических мероприятий [10, 11].

Для обнаружения *Bacillus anthracis* в объектах окружающей среды и биологическом материале в Ставропольском НИПЧИ разработаны сибиреязвенные иммуноглобулины флуоресцирующие вегетативные и споровые, представляющие собой иммуноглобулиновые фракции к водорастворимому антигену *B. anthracis*, выделенные из кроличьих сывороток и адсорбированные на магнимму-

носорбентах водорастворимыми антигенами штаммов *B. cereus*. Проведенные медицинские испытания показали их диагностическую ценность и возможность использования для обнаружения *B. anthracis* в лабораторной диагностике сибирской язвы [12].

Важное место отводится проведению исследований инфицированного материала серологическими методами с помощью сывороток, диагностикумов и ИФА [13, 14]. В практическом здравоохранении до середины 90-х лет прошлого столетия широко применялись эритроцитарные антигенные и иммуноглобулиновые диагностикумы, полученные на основе протективного антигена (ПА) или антигена к нему. Однако в последние годы в Российской Федерации эритроцитарные диагностикумы не производят.

В связи с этим, представляет научный и практический интерес использование ПА, выделенного гель-хроматографией из культурального фильтрата токсинпродуцирующего штамма при разработке более совершенных диагностических препаратов для обнаружения антител к возбудителю сибирской язвы. С применением сибиреязвенных антигенных препаратов (диагностикум и тест-система), разработанных в Волгоградском научно-исследовательском противочумном институте, диагноз сибирская язва в РНГА был подтвержден в 95% случаев при исследовании образцов почв из скотомогильников и мест убоя больных животных [15].

Иммуноферментная тест-система на основе ПА широко использовалась для определения антител в сыворотках крови животных и людей при изучении химических и живых вакцин, а также для диагностики сибирской язвы при эпидемических вспышках и биотеррористическом акте в США в 2001 г. [16].

В источниках литературы при обнаружении антител к ПА в сыворотках крови экспериментальных животных, вакцинированных и больных сибирской язвой людей, одни авторы указывают на более высокую чувствительность ИФА, по данным других — РНГА и ИФА равноценны. При этом отмечается нестабильность эритроцитарных диагностикумов, полученных с использованием не обработанных формалином эритроцитов [17].

Известно, что диагностические тест-системы оценивают по их чувствительности, специфичности и воспроизводимости. Кроме этого, не менее важным является время, затрачиваемое на проведение анализа и получение результата [18]. Одним из простых и надежных методов обнаружения возбудителей инфекционных заболеваний является реакция латекс-агглютинации, отличающаяся простотой постановки, возможностью быстрого получения ответа, отсутствием необходимости использования специальных устройств для регистрации результатов. Реакция латекс-агглютинация основана на специфическом взаимодействии антител, иммобилизованных на твердом носителе (полиакролеиновых микрочастицах), с целевыми микроорганизмами или их компонентами с образованием визуально регистрируемого агглютината. Очевидно, что при разработке латексных диагностикумов преимущество должно отдаваться моноклональным антителам как более стандартным и высокоспецифичным иммунологическим компонентам.

Основное направление исследований по разработке экспресс-методов ориентировано не только на сокращение времени учета результатов, повышение их чувствительности и специфичности, но и на максимальную простоту постановки реакции и сокращение энерго- и трудовых затрат. Учеными Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии (ГНЦ ПМБ) проведены исследования по иммобилизации моноклональных антител на твердом носителе (латексных микрочастицах) и подбору оптимальной их нагрузки. Показано, что наибольшая чувствительность реакции латекс-агглютинации наблюдалась при использовании моноклональных антител 1Е6 при их нагрузке на латексных частицах в количестве 20 мкг на 50 мкл. В результате проведенных испытаний экспериментальных образцов латексного диагностикума на основе МКА 1Е6, 6В6 и 3Г3 установлено, что чувствительность реакции с инактивированными культурами штаммов *B. anthracis* и четырех близкородственных штаммов значительно увеличивается с использованием МКА 1Е6 по сравнению с другими антителами [19].

Одними из последних примеров подобных разработок являются экспериментальные образцы «Набор реагентов для определения спор *B. anthracis* в реакции латекс-агглютинации» и «Набор реагентов для быстрой идентификации вегетативной формы возбудителя сибирской язвы (Тест-полоска *B. anthracis*)», сконструированные в ГНЦ ПМБ. Принцип работы латексного диагностикума основан на специфическом взаимодействии спор *B. anthracis* с моноклональными антителами (МКА), сорбированными на латексе. Чувствительность при выявлении спор *B. anthracis* методом латексной агглютинации составляет  $2 \times 10^6$  спор/мл и, что особенно важно, диагностикум не выявляет близкородственные микроорганизмы рода *Bacillus* в концентрации  $2,5 \times 10^8$  спор/мл и менее [20].

Чувствительным, специфичным и оперативным методом идентификации микроорганизмов и токсинов, пригодным для применения в условиях небольших стационарных и мобильных лабораторий, а также в полевых ус-

ловиях, является иммунохроматографический анализ. Данный метод направлен на выявление и идентификацию бактериальных вегетативных клеток, спор, вирусов, токсинов при анализе неизвестных порошков, смывов из окружающей среды, а также при исследовании проб пищевых продуктов. В последние годы широкое применение находят иммунохроматографические тесты (ИХ-тест *B. anthracis*), представляющие собой портативные индикаторные полоски — «стрипы». Показано, что «Тест-полоска *B. anthracis*» обладает чувствительностью  $1 \times 10^9$  м.к./мл и высоким уровнем специфичности — при использовании микробных взвесей штаммов близкородственных сапрофитов рода *Bacillus* были получены только отрицательные результаты [21].

Известны иммунохроматографические экспресс-тесты Singlepath и Duopath производства фирмы «Merck» (Германия) для выявления бактерий рода *Salmonella*, *Listeria*, *Escherichia coli* O157:H7 и веротоксина энтерогеморрагических штаммов *E. coli* в пищевых продуктах и продовольственном сырье, водных объектах окружающей среды и биоматериале человека. Чувствительность определения по данной методике составляет для бактерий *Listeria monocytogenes* —  $10^4$ – $10^6$  м.к./мл, бактерий рода *Salmonella* —  $10^4$ – $10^7$  м.к./мл, *E. coli* O157:H7 —  $10^4$ – $10^7$  м.к./мл.

Достаточно перспективными и информативными являются исследования, проведенные сотрудниками ГосНИИ биологического приборостроения, направленные на выявление бактерий, вирусов и токсинов в различных объектах окружающей среды иммунохроматографическим методом с люминесцентной детекцией.

Разработана отечественная укладка иммунохроматографических индикаторных элементов УИХЭ-1 (ГосНИИ биологического приборостроения) для выявления возбудителей чумы, туляремии, сапа, сибирской язвы и ботулинического токсина типа А в смывах из объектов окружающей среды. Чувствительность метода по данным авторов составляет  $1 \times 10^5$ – $1 \times 10^6$  м.к./мл и 250 нг/мл ботулинического токсина типа А, а длительность анализа без учета времени пробоподготовки — 25–30 мин [22]. Указанное иммунохроматографическое техническое средство имеет колориметрический принцип регистрации и основано на применении золь коллоидного золота, используемых в качестве маркера антител [23].

Чувствительность иммунохроматографических тестов близка к чувствительности РНГА и ИФА, но в то же время, исключает такие стадии анализа, как сенсibilизацию полистирольных планшетов, разведение пробы, промывку, внесение хромогенных субстратов и меченных ферментной меткой антител. Методологические приемы, позволяющие многократно повысить чувствительность иммунохроматографического анализа за счет люминесцентного метода детекции, сохранили такие достоинства метода, как отсутствие многостадийности процедуры и применение минимума реагентов.

Методы экспресс-диагностики, такие как бактериоскопический, молекулярно-генетический и иммунофлуоресцентный, успешно применяются при расшифровке вспышек сибирской язвы. Опыт эпидемиологического расследования вспышки сибирской язвы в республике Бурятия в 2008 г. наглядно показывает значимость комплексного подхода применения методов экспресс-диагностики. Результаты проведенных исследований позволили в ранние сроки (через 3–5 ч от начала исследования) подтвердить клинический диагноз «сибирская язва» у за-

болевших людей, выявить источник инфекции (больное животное), определить фактор передачи (мясо) и оперативно доказать неблагополучную эпизоотолого-эпидемиологическую ситуацию на данной территории [24, 25].

В научных лабораториях многих стран постоянно разрабатываются и совершенствуются диагностические технологии для индикации и идентификации особо опасных этиологических агентов, в том числе и сибиреязвенного микроба. На современном этапе наиболее актуальным направлением является использование в диагностике сибирской язвы молекулярно-генетических методов [26–29].

В учреждениях практического здравоохранения с 2000 г. успешно применяется тест-система для выявления ДНК *B. anthracis* рХО1<sup>+</sup> методом ПЦР (ГенСиб) (РосНИПЧИ «Микроб») с детекцией результатов методом электрофореза. Однако данная тест-система не позволяет дифференцировать вирулентные и авирулентные штаммы сибиреязвенного микроба, так как обнаруживает только ген *pagA*(рХО1). С целью совершенствования лабораторной диагностики на этапах идентификации внутри- и межвидовой дифференциации сибиреязвенного микроба в ЦНИИ эпидемиологии и РосНИПЧИ «Микроб» разработан набор реагентов для выявления вегетативных форм и спор *B. anthracis* *pagA* (плаزمиды рХО1) *capA* (плазмиды рХО2) в биологическом материале и объектах окружающей среды методом ПЦР в режиме «реального времени» (Амплиценс *B. anthracis*-FRT). Диагностическая ценность набора реагентов была изучена в комиссионных испытаниях на большой выборке штаммов *B. anthracis* и близкородственных микроорганизмов, а также контаминированных проб объектов окружающей среды и биологического материала. Для предотвращения получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов в набор реагентов введен внутренний контрольный образец (ВКО). Использование подобного варианта постановки ПЦР позволяет снизить время, затрачиваемое на проведение одного анализа, за счет исключения этапа электрофореза, а также риска контаминации ампликонами реагентов или исследуемых проб [30].

Перспективность применения методов молекулярно-типирования *B. anthracis* показано учеными Ставропольского НИПЧИ в рамках деятельности Референс-центра по мониторингу за возбудителем сибирской язвы. Специалисты обобщили опыт использования генотипирования при проведении эпидемиологического расследования вспышек сибирской язвы. Отмечено, что генотипирование с применением многолокусного переменного анализа (MLVA) с анализом от 8 до 25 VNTR-локусов при изучении штаммов *B. anthracis*, выделенных в Российской Федерации на сопредельных территориях, позволяет проводить корректное сравнение генотипов с данными всемирной MLVA-базы данных [31].

Возбудитель сибирской язвы до недавнего времени считался генетически высокомономорфным. Индивидуальные различия геномов штаммов стали очевидными только после внедрения наиболее результативных методов молекулярного типирования, основанных на многолокусном анализе переменных областей генома *B. anthracis*. В Ставропольском НИПЧИ разработан методический подход к генетическому типированию возбудителя сибирской язвы, состоящий в сочетании использования MLVA, анализа PCR-RFLP PA и SNR. Включение в схему PCR-RFLP PA или SNR-локуса 16 A sh дает возможность разделить штаммы из одной вспышки на группы, имею-

щие одинаковый MLVA-генотип. Проведенные исследования позволили разработать базу генотипов коллекционных штаммов сибиреязвенного микроба *B. anthracis* genotypes, выделенных в различных регионах Российской Федерации и неблагополучных по сибирской язве республиках СНГ [32–34].

В настоящее время в мировой практике молекулярное типирование возбудителя сибирской язвы проводят, применяя метод MLVA в качестве самостоятельного, а также в сочетании с другими методами. В частности, MLVA дополняют анализом медленно эволюционирующих единичных нуклеотидных полиморфизмов и единичных нуклеотидных повторов, являющихся одной из разновидностей VNTR-локусов и обладающих очень высокой частотой мутаций [35].

В оригинальном варианте MLVA выполняется с использованием флуоресцентно-меченых праймеров и анализа фрагментов амплификации в автоматическом анализаторе ДНК, что требует дорогостоящего оборудования и реактивов. Авторами предложена более доступная модификация MLVA с использованием немеченых праймеров к VNTR-локусам, электрофоретического разделения фрагментов амплификации в агарозном геле, фрагментного анализа с помощью цифровой системы визуализации и компьютерной программы [36].

Интересными в научном плане являются разработки, сделанные в ГНЦ ПМБ с использованием современных генно-инженерных методов идентификации сибиреязвенных штаммов, выделенных из почвы, с последующими сравнительными молекулярно-генетическими исследованиями. С целью повышения эффективности типирования микроорганизмов исследователями предлагаются различные комбинации методов в зависимости от поставленных задач, но, вследствие высокой генетической мономорфности сибиреязвенного микроба, предпочтение отдают мультилокусному VNTR-анализу [37].

Результаты проведенного MLVA-8-генотипирования штаммов *B. anthracis*, выделенных за последние 55 лет на территории Российской Федерации и СНГ, позволили отнести штаммы как к описанным генотипам, так и выявить уникальные генотипы с их географической привязанностью. Анализ восьми VNTR-локусов позволил определить характерный генотип, присущий штаммам с комплексом атипичных свойств, генотипические особенности штаммов *B. anthracis* с различным проявлением признаков, ассоциированных с патогенностью. Проведение ПЦР с соответствующими видоспецифическими праймерами дает возможность не только идентифицировать выделенные из почвы сибиреязвенные штаммы и оценить их эпидемиологическую опасность, но и провести сравнительные молекулярно-генетические исследования. Использование метода мультилокусного определения переменного числа тандемных повторов (VNTR) позволяет обнаружить значительное внутривидовое разнообразие возбудителя сибирской язвы. По результатам ретроспективного исследования можно судить о характере вспышки сибирской язвы на территории, происхождении штаммов, что имеет весьма существенное значение для эпидемиологического расследования [38].

MLVA-генотипирование и секвенирование также используются при проведении оперативного эпидемиологического расследования с целью установления причинно-следственных связей формирования эпидемического неблагополучия по сибирской язве. Применение данных методик позволяет оперативно решить вопрос в отноше-

нии выявления источника инфекции, путей и факторов передачи. При проведении лабораторного исследования материала от заболевших людей выделение культуры не всегда возможно, особенно, если отбор материала осуществлен после начала антибиотикотерапии [39].

Помимо этого использование MLVA-генотипирования при мониторинге за циркуляцией возбудителя сибирской язвы, анализе штаммов, выделенных в Российской Федерации и на сопредельных территориях, позволяет проводить корректное сравнение генотипов со всемирной MLVA-базой данных и прогнозировать возникновение вспышек сибирской язвы [40].

Р. Keim с соавторами оценивали эпидемическую значимость выделенных штаммов по результатам ПЦР с видоспецифическими праймерами и по данным многолокусного VNTR-анализа. Исследователями показана принципиальная возможность использования данной комплексной методики для типизации сибиреязвенных штаммов и их дифференциации от близкородственных микроорганизмов [41].

В настоящее время для лабораторной диагностики ряда инфекций пристальное внимание исследователей привлекают бактериофаги. Свою значимость бактериофаги приобрели как диагностические средства, позволяющие дифференцировать возбудителей инфекционных заболеваний, а также проводить более детальную дифференциацию отдельных типов и вариантов внутри данного вида. Особую ценность приобретает этот метод при идентификации атипичных по капсулообразованию, вирулентности и биохимическим свойствам штаммов сибиреязвенного микроба. По данным А. Г. Рязановой с соавторами, частота выделения атипичных штаммов возбудителя сибирской язвы приблизительно равна частоте выделения штаммов, ошибочно идентифицированных как *B. anthracis* [42]. Это объясняется общностью свойств *B. anthracis* с близкородственными микроорганизмами рода *Bacillus*, что значительно затрудняет их идентификацию.

Создание препаратов для фагоидентификации бактерий основано на лизисе, сопровождающимся выходом в среду новых вирионов фага. Возможность фагоидентификации вытекает из специфичности действия фагов, которая может быть настолько выражена, что позволяет дифференцировать не только отдельные виды, но и серологически неотличимые штаммы в пределах одного вида [43]. В связи с этим, все большее число исследователей предпочитают обращаться к фаговому тесту, способному дифференцировать близкородственные штаммы. В СтавНИПЧИ разработан бактериофаг диагностический сибиреязвенный Гамма А-26, представляющий собой стерильный фильтрат фаголизата бульонной культуры штамма *B. anthracis* 228/8, содержащий взвесь частиц фага Гамма А-26, обладающих лизирующим действием в отношении штаммов *B. anthracis*. Результаты проведенных комиссионных испытаний свидетельствуют о широком диапазоне литического спектра бактериофага и подтверждают возможность его использования при идентификации штаммов *B. anthracis* в лабораторной диагностике [44].

Особый научный интерес представляют разработки питательных сред для выделения и идентификации возбудителя сибирской язвы. Используемым в настоящее время питательным средам свойственны те или иные недостатки [45]. В некоторых случаях — это нестабильность проявления дифференцирующих признаков, например, фосфатазобразованиия, продукции лецитиназы и других биохимических особенностей *B. anthracis* и близкородст-

венных бацилл. В других — невозможность проведения внутривидовой дифференциации штаммов *B. anthracis* (вирулентных и аттенуированных).

Заслуживают внимания исследования специалистов ГНЦ ПМБ по конструированию дифференциально-диагностической питательной среды для выделения и идентификации возбудителя сибирской язвы с дополнительным внесением антибиотика, позволяющей дифференцировать по цвету и морфологии колонии вирулентных (капсулообразующих) и авирулентных (бескапсульных) штаммов *B. anthracis*, а также близкородственных сапрофитных микроорганизмов [45, 46].

Одним из перспективных направлений развития экспресс-индикации возбудителей инфекционных заболеваний считается энзимоиндикационное, связанное с наличием у микроорганизма определенных биохимических свойств, отличающих его от других представителей данного рода. Это направление может быть реализовано посредством использования дифференциально-диагностических питательных сред.

Таким образом, анализ литературы свидетельствует о том, что научные исследования многих стран мира направлены на разработку и совершенствование диагностических технологий для обнаружения и идентификации опасных этиологических агентов, одним из которых является сибиреязвенный микроб. Учитывая вышеизложенное, следует отметить, что пути совершенствования диагностических сибиреязвенных препаратов должны предусматривать разработку и внедрение в практическое здравоохранение новых препаратов для замены устаревших и малоэффективных, а также препаратов, основанных на современных технологиях многофакторного анализа (мультиплексная ПЦР, масс-спектрометрия, xMAP-многопараметрический флуоресцентный анализ, биочипы и др.).

## Литература

1. Абрамов ДД, Воробьев АА, Кузнецовский АВ, Савиных АВ, Онучина НВ, Дармов ИВ, Трофимов ДЮ, Кузнецов СЛ. Разработка и испытания молекулярно-биологической тест-системы для выявления ДНК возбудителя сибирской язвы методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Клиническая лабораторная диагностика 2011; (3): 46–50.
2. Антюганов СН, Рязанова АГ, Еременко ЕИ, Куличенко АН. Сибирская язва в Российской Федерации и за рубежом. Эпидемиология и инфекционные болезни 2012; (5): 4–8.
3. Буравцева НП, Мицаев ШШ, Мезенцев ВМ, Рязанова АГ, Еременко ЕИ, Куличенко АН. Эпизоотологическая и эпидемиологическая обстановка по сибирской язве в Чеченской Республике и Республике Дагестан. Эпидемиология и инфекционные болезни 2011; (3): 10–5.
4. Artenstein AW. Anthrax: from antiquity to answers. J Infect Dis. 2007; 195(4): 471–3.
5. Саяпина ЛВ, Абдрашитова АС, Комратов АВ, Ращепкин ЛИ, Осин АВ, Храмов МВ и др. Характеристика новых препаратов для диагностики сибирской язвы по данным медицинских испытаний. Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. 23–24 мая 2012. Ставрополь: Экспо-Медиа; 2012.
6. Шарова ИН, Казанова ЕС, Карнаухов ИГ, Щербанов ДА, Щербанова СА, Самойлова ЛВ и др. Принципы организации и проведение лабораторной диагностики в мобильной лаборатории индикации для осуществления эпизоотологического мониторинга особо опасных и других природно-очаговых инфекций. Проблемы особо опасных инфекций 2012; (3): 94–6.
7. Egren J, Hamidjaja Raditijo A, Hansen T, Ruuls R, Thierry S, et al. In silico and in vitro evaluation of PCR-based assays for the detec-

- tion of *Bacillus anthracis* chromosomal signature sequences. *J Virulence* 2013; 4(8): 671–85.
8. Шарова ИН, Казакова ЕС, Портенко СА, Красовская ТЮ, Осина НА, Куклев ВЕ. и др. Совершенствование и стандартизация лабораторной диагностики особо опасных, «новых» и «возвращающихся» инфекционных болезней. *Проблемы особо опасных инфекций* 2013; (2): 46–8.
  9. Katan WE, Hulst A.G., Roffel S, van der Schans M, Merkel T, van Belkum A, Bikker F.J. Peptide-based fluorescence resonance energy transfer protease substrates for the detection and diagnosis of *Bacillus* species. *Anal Chem.* 2011; 83(7): 2511–7.
  10. Куличенко АН, Еременко ЕИ, Буравцева НП, Рязанова АГ. Диагностика сибирской язвы в Российской Федерации. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2010; (5): 62–6.
  11. Саяпина ЛВ, Малахаева АН, Касина ИВ, Барулина ИС. Анализ качества диагностических флуоресцирующих иммуноглобулинов, используемых для выявления возбудителей особо опасных инфекций. *Биопрепараты* 2007; (2): 26–8.
  12. Лобач РН, Абдрашитова АС, Саяпина ЛВ. Испытания сибиреязвенных флуоресцирующих иммуноглобулинов, предназначенных для выявления возбудителя сибирской язвы. *Биопрепараты* 2013; (4): 29–33.
  13. Барнова ИА, Алексеев ВВ, Липницкий АВ, Барнов АМ. Использование иммуноглобулинов сибиреязвенной монорецепторной сыворотки для идентификации *Bacillus anthracis* в МФА. В кн.: *Материалы IX Межгосударственной научно-практической конференции государств-участников СНГ. 30 сентября — 2 октября 2008. Волгоград: ВолгГМУ; 2008.*
  14. Маринин ЛИ, Дятлов ИА, Мокриевич АН, Бахтеева ИВ, Белова ЕВ, Борзилов АИ и др. Методы изучения биологических свойств возбудителя сибирской язвы. М.: Гигиена; 2009.
  15. Барнов АМ, Барнова ИА, Алексеев ВВ, Липницкий АВ, Кулаков МЯ. Обнаружение антител к протективному антигену *Bacillus anthracis* с использованием реакции непрямой гемагглютинации и твердофазного иммуоферментного метода. *Проблемы особо опасных инфекций* 2010; 105: 42–5.
  16. Öncü Serkan, Öncü Selcen, Serhan Sakarya. Anthrax — an overview. *Med Sci Monit.* 2003; 9(11): 276–83.
  17. Терешкина НЕ, Девдариани ЗЛ. Современное состояние проблемы иммунодетекции возбудителя сибирской язвы. *Проблемы особо опасных инфекций* 2008; (1): 44–8.
  18. Шишкова НА, Кравченко ТБ, Маринин ЛИ, Мокриевич АН. Идентификация возбудителя сибирской язвы, выделенного из почвы скотомиогильника. *Проблемы особо опасных инфекций* 2011; (4): 53–6.
  19. Хлынцова АЕ, Лунева НМ, Белова ЕВ, Дятлов ИА, Шемякин ИГ. Разработка и испытания диагностикума на основе моноклональных антител для определения спор возбудителя сибирской язвы в реакции латекс-агглютинации. *Проблемы особо опасных инфекций* 2011; (4): 71–5.
  20. Кравец ЕВ, Дугаржапова ЗФ, Родзиковский АВ, Хлынцова АЕ, Лунева НМ, Белова ЕВ и др. Применение методов латекс-агглютинации и иммунохроматографии для ускоренной идентификации культур *Bacillus anthracis* при эпидемиологических расследованиях вспышек. *Проблемы особо опасных инфекций* 2011; (1): 81–2.
  21. Хлынцова АЕ, Баранова АМ, Белова ЕВ, Шемякин ИГ, Маринин ЛИ, Дятлов ИА. Изучение свойств моноклональных антител для разработки иммунохроматографического стрип-теста с целью определения спор возбудителя сибирской язвы. В кн.: *Материалы IX Межгосударственной научно-практической конференции государств-участников СНГ. 30 сентября — 2 октября 2008. Волгоград: ВолгГМУ; 2008.*
  22. Соловьев ПВ, Баранова ЕВ, Рудницкий СЮ, Королева-Ушакова АГ, Колосова НВ, Бикетов СФ. Разработка иммунохроматографических тестов для идентификации спор и вегетативных клеток *B. anthracis*. *Материалы научно-практической школы-конференции молодых ученых и специалистов научно-исследовательских организаций Роспотребнадзора. 25–27 мая 2010 г. Оболенск: А-ПРИНТ; 2010.*
  23. Ярков СП, Шиленко ИВ, Скопинская СН, Злобин ВН. Комплект для выявления возбудителей особо опасных заболеваний и токсинов люминесцентным иммунохроматографическим анализом. *Проблемы особо опасных инфекций* 2008; (2): 46–9.
  24. Горобец ЕА. Разработка иммунобиологических препаратов для диагностики сибирской язвы: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Ставрополь; 2009.
  25. Дугаржапова ЗФ, Родзиковский АВ, Чеснокова МВ, Балахонов СВ, Болошинов АБ, Ханхареев СС. и др. Эпизоотолого-эпидемиологический анализ ситуации по сибирской язве в Республике Бурятия (1995–2008). *Эпидемиология и инфекционные болезни* 2010; (6): 11–5.
  26. Гаранина СБ, Тучнов ИВ, Куличенко АН, Куклев ЕВ, Пикалов ИН. Использование ПЦР-анализа при работе в очаге сибирской язвы. В кн.: *Сборник тезисов докладов 3-й Всероссийской научно-практической конференции 25–27 января 2000 г. Москва. М.; 2000.*
  27. Еременко ЕИ, Рязанова АГ, Цыганкова ЕА, Цыганкова ОИ, Куличенко АН. Генотипические особенности штаммов *Bacillus anthracis* с разным проявлением признаков, ассоциированных с патогенностью. *Проблемы особо опасных инфекций* 2010; (2): 53–6.
  28. Чеканова ТА, Кирдяшкина НП, Пудова ЕА, Сажин АИ, Судьина АЕ, Маркелов МЛ, Шипулин ГА. Наборы реагентов для идентификации возбудителей особо опасных инфекций в формате иммуночипов и ДНК-чипов. *Материалы V Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням. Москва; 2013. С. 441–2.*
  29. Яцышина СБ, Обухов ИЛ, Кириллов ЛВ, Саленко ЛС, Шмаргуун БИ, Шипулин ГА. Применение мультиплексной ПЦР для идентификации вирулентных форм возбудителей сибирской язвы. *Материалы IV Всероссийской научно-практической конференции. Тверь; 2002.*
  30. Абдрашитова АС, Саяпина ЛВ, Малахаева АН, Осина НА. Оценка эффективности наборов реагентов «Амплисенс» для индикации возбудителей особо опасных инфекций методом ПЦР в режиме «реального» времени. *Здоровье населения и среда обитания* 2013; (1): 32–4.
  31. Цыганкова ЕА, Еременко ЕИ, Рязанова АГ, Цыганкова ОИ, Куличенко АН. Мультиплексная ПЦР-тест система для обнаружения возбудителя сибирской язвы с детекцией результатов в формате «реального времени». *Проблемы особо опасных инфекций* 2013; (1): 81–4.
  32. Кутыров ВВ, Смирнова НИ. Генодиагностика и молекулярное типирование возбудителей чумы, холеры и сибирской язвы. *Молекулярная генетика, микробиология, вирусология* 2003; (1): 6–14.
  33. Цыганкова ЕА, Еременко ЕИ, Цыганкова ОИ, Рязанова АГ. Полиморфизм гена протективного антигена у вариантов штаммов *Bacillus anthracis*, обнаруживаемый методом PCR RFLP анализа. В кн.: *Материалы IX Межгосударственной научно-практической конференции государств-участников СНГ. 30 сентября — 2 октября 2008. Волгоград: ВолгГМУ; 2008.*
  34. Harrell LJ, Andersen GL, Wilson KH. Genetic variability of *Bacillus anthracis* and related species. *J Clin Microbiol.* 1995; 33(7): 1847–50.
  35. Лиманская ОЮ, Муртазаева ЛА, Klee S, Лиманский АП. Молекулярные технологии детекции возбудителя сибирской язвы посредством ПЦР различных форматов. *Биотехнология* 2013; (3): 86–96.
  36. Ezzell JW, Abshire T, Ibrahim S, Teska J, et al. Identification of *Bacillus anthracis*: an overview. *3rd International Conference on Anthrax. Plymouth, England, 7–10 Sept., 1998.*
  37. Шишкова НА, Мокриевич АН, Платонов МЕ, Светоч ТЭ, Маринин ЛИ. Изучение генетического разнообразия штаммов сибиреязвенного микроба из коллекции ГНЦ ПМБ. *Проблемы особо опасных инфекций* 2010; (2): 60–5.
  38. Рязанова АГ, Еременко ЕИ, Цыганкова ОИ, Цыганкова ЕА, Куличенко АН. Использование методов молекулярного типирования *Bacillus anthracis* в Референс-центре по мониторингу за возбудителем сибирской язвы. *Проблемы особо опасных инфекций* 2011; (4): 68–70.
  39. Амосов МЮ, Кузнецовский АВ, Сероглазов ВВ, Савиных АВ, Онучина НВ, Воробьев АА, и др. Идентификация и дифференциация микробных культур возбудителя сибирской язвы, выделенных на территории Южного федерального округа в мае 2007 г. *Молекулярная медицина* 2011; (6): 43–8.

40. Beyer W, Turnbull PCB. Anthrax in animals. *Molecular Aspects of Medicine* 2009; 30(6): 481–9.
41. Keim P, Price LB, Klevytska AM, Smith KL, Schupp JM, Okinaka R, et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol*. 2000; 182(10): 2928–36.
42. Рязанова АГ, Еременко ЕИ, Цыганкова ОИ, Цыганкова ЕА. Усовершенствование методов идентификации атипичных штаммов возбудителя сибирской язвы и их дифференциация от близкородственных бацилл. *Журнал микробиология, эпидемиология и иммунология* 2009; (3): 76–80.
43. Ризвава С, Натидзе М, Бубашвили М, Гогиашвили Д, Вардзелашвили Н. Идентификация штаммов *B. anthracis*, выделенных из различных объектов, и серодиагностика сибирской язвы. *Аллергология и иммунология* 2010; 2(11): 123–5.
44. Головинская ТМ, Буравцева НР, Цыганкова ОИ, Еременко ЕИ. Сравнительное изучение литической активности и специфичности экспериментальных серий сибиреязвенных бактериофагов Гамма А-26, К ВИЭВ, ВА-9 и Fah-BH ИИВВУМ. *Проблемы особо опасных инфекций* 2011; (3): 28–30.
45. Желудкова ЕВ, Климов ВИ, Бывалов АА, Зиганшин РШ, Ковтунов ВП. Совершенствование системы контроля качества питательных сред, используемых в микробиологии. В кн.: *Диагностика, лечение и профилактика опасных инфекционных заболеваний. Биотехнология. Ветеринария. Матер. юбилейной науч. конф., посвященной 70-летию НИИ микробиологии МО РФ. 1998. С. 298–299.*
46. Говорунова ВА, Маринин ЛИ, Миронова РИ, Храмов МВ, Мокричев АН, Баранов АМ. *Диагностическая питательная среда для выделения и идентификации возбудителя сибирской язвы. Проблемы особо опасных инфекций* 2012; (2): 82–4.

## Об авторах

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, 8, стр. 2.

Саяпина Лидия Васильевна. Главный эксперт Управления экспертизы противобактериальных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук.

Бондарев Владимир Петрович. Директор Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук, профессор.

Никитюк Надежда Федоровна. Главный эксперт Управления экспертизы противобактериальных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук, профессор.

Федеральное государственное казенное учреждение «294 Центр спасательных операций особого риска» Министерства чрезвычайных ситуаций Российской Федерации. Российская Федерация, 142771, Москва, поселок завода Мосрентген, Музыкальный проезд. Лобач Роман Николаевич. Начальник группы биологической защиты.

Адрес для переписки: Саяпина Лидия Васильевна; Sayapina@expmed.ru

## Current status of the laboratory diagnosis of anthrax: detection and identification of *Bacillus anthracis*

L. V. Sayapina<sup>1</sup>, R. N. Lobach<sup>2</sup>, V. P. Bondarev<sup>1</sup>, N. F. Nikityuk<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Federal State-Owned Institution «294th Center for Extra-Risk Rescue Operations» of the Ministry of Emergency Situations of the Russian Federation, Moscow, Russia

The present article summarizes the materials from literary sources dedicated to the issues of laboratory diagnosis of anthrax. It shows the priority of the development of new methods for the elaboration of highly sensitive test systems and preparations designed for the detection and identification of anthrax bacteria. It outlines the role of express-diagnostics of infectious diseases, which is very important when investigating bioterrorism cases, outbreaks and sporadic cases in humans and animals. Providing with the analysis of different methods for detection of anthrax, the article at the same time focuses on modern molecular diagnostic technologies. It is shown that the basic parameters of diagnostic test systems are sensitivity, specificity and reproducibility of the results. The article presents data on the development of culture media for isolation and identification of anthrax, as well as the possibility of using anthrax bacteriophage for phage-based indication and identification of bacteria.

**Key words:** anthrax; detection; identification; diagnostic preparations; test systems; molecular genetic methods.

**For citation:** Sayapina LV, Lobach RN, Bondarev VP, Nikityuk NF. Current status of the laboratory diagnosis of anthrax: detection and identification of *Bacillus anthracis*. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16 (1): 27–34.

## References

- Abramov DD, Vorobyev AA, Kuznetsovsky AV, Savinykh AV, Onuchina NV, Darmov IV, et al. The development and testing of a molecular biological test systems for DNA detection of anthrax pathogen by real-time polymerase chain reaction assay. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika* 2011; (3): 46–50 (in Russian).
- Antyuganov SN, Ryzanova AG, Eremenko EI, Kulichenko AN. Anthrax in the Russian Federation and abroad. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni* 2012; (5): 4–8 (in Russian).
- Buravtseva NP, Mitsaev ShSh, Mezentsev VM, Ryzanova AG, Eremenko EI, Kulichenko AN. *Epizootological and epidemiological situation on anthrax in the Chechen Republic and the Republic of Dagestan. Epidemiologiya i infektsionnye bolezni* 2011; (3): 10–5 (in Russian).
- Artenstein AW. Anthrax: from antiquity to answers. *J Infect Dis*. 2007; 195(4): 471–3.
- Sayapina LV, Abdrashitova AS, Komratov AV, Rashchepkin LI, Osin AV, Hramov MV, et al. Characteristics of new drugs for the diagnosis of anthrax according to medical tests. *Materials of All-Russian scientific-practical conference with international participation. May 23–24, 2012. Stavropol: Expo-Media; 2012* (in Russian).

6. Sharova IN, Kazakova ES, Karnauhov IG, Shcherbakov DA, Shcherbakova SA, Samoylova LV, et al. Principles of the organization and carrying out of laboratory diagnostics in the display of mobile laboratories for epizootological monitoring of especially dangerous and other natural focal infections. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; (3): 94–6 (in Russian).
7. Egren J, Hamidjaja Raditijo A, Hansen T, Ruuls R, Thierry S, et al. *In silico* and *in vitro* evaluation of PCR-based assays for the detection of *Bacillus anthracis* chromosomal signature sequences. *J Virulence* 2013; 4(8): 671–85.
8. Sharova IN, Kazakova ES, Portenko SA, Krasovskaya TYu, Osina NA, Kuklev VE, et al. Improving and standardizing laboratory diagnosis of highly dangerous, “new” and “returning” infectious diseases. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; (2): 46–8 (in Russian).
9. Kaman WE, Hulst AG., Roffel S, van der Schans M, Merkel T, van Belkum A, Bikker FJ. Peptide-based fluorescence resonance energy transfer protease substrates for the detection and diagnosis of *Bacillus* species. *Anal Chem.* 2011; 83(7): 2511–7.
10. Kulichenko AN, Eremenko EI, Buravtseva NP, Ryazanova AG. Diagnosis of anthrax in the Russian Federation. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii, Immunobiologii* 2010; (5): 62–6 (in Russian).
11. Sayapina LV, Malahaeva AN, Kasina IV, Barulina IS. Analysis of the quality of diagnostic fluorescent antibodies used to detect pathogens of especially dangerous infections. *Biopreparaty* 2007; (2): 26–8 (in Russian).
12. Lobach RN, Abrashitova AS, Sayapina LV. Tests anthrax fluorescent antibodies for the detection of the causative agent of anthrax. *Biopreparaty* 2013; (4): 29–33 (in Russian).
13. Barkova IA, Alexeev VV, Lipnitsky AV, Barkov AM. The use of mono-receptor anthrax serum immunoglobulins to identify *Bacillus anthracis* in the IAF. In: *Proceedings of the IX Interstate Scientific and Practical Conference of CIS member states. September 30 — October 2, 2008. Volgograd: VolgGMU; 2008* (in Russian).
14. Marinin LI, Dyatlov IA, Mokrievich AN, Bahteeva IV, Belova EV, Borzilov AI, et al. *Methods of studying the biological properties of anthrax. Moscow: Gigiena; 2009* (in Russian).
15. Barkov AM, Barkova IA, Alexeev VV, Lipnitsky AV, Kulakov MYa. Detection of antibodies to *Bacillus anthracis* protective antigen using the indirect hemagglutination, and ELISA method. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2010; 105: 42–5 (in Russian).
16. Öncü Serkan, Öncü Selcen, Serhan Sakarya. Anthrax — an overview. *Med Sci Monit.* 2003; 9(11): 276–83.
17. Tereshkina NE, Devdariani ZL. Current status of the immunodetection of anthrax. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2008; (1): 44–8 (in Russian).
18. Shishkova NA, Kravchenko TB, Marinin LI, Mokrievich AN. Identification of anthrax isolated from cattle burial ground. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; (4): 53–6 (in Russian).
19. Hlyntseva AE, Luneva NM, Belova EV, Dyatlov IA, Shemyakin IG. Development and testing diagnostic kit based on monoclonal antibodies to determine the anthrax pathogen in the reaction of latex agglutination. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; (4): 71–5 (in Russian).
20. Kravets EV, Dugarzhapova ZF, Rodzikovskiy AV, Hlyntseva AE, Luneva NM, Belova EV, et al. Application of latex agglutination and immunochromatography for rapid identification of *Bacillus anthracis* cultures in epidemiological investigations of outbreaks. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; (1): 81–2 (in Russian).
21. Hlyntseva AE, Baranova EV, Belova EV, Shemyakin IG, Marinin LI, Dyatlov IA. The study of the properties of monoclonal antibodies for the development of immunoassay test strip to determine the anthrax pathogen. In: *Proceedings of the IX Interstate Scientific and Practical Conference of CIS member states. September 30 — October 2, 2008. Volgograd: VolgGMU; 2008* (in Russian).
22. Soloviev PV, Baranova EV, Rudnitskiy SYu, Koroleva-Ushakova AG, Kolosova NV, Biketov SF. Development of immunoassay for identification of spores and vegetative cells of *B. anthracis*. Materials of scientific-practical school-conference of young scientists and specialists of research organizations of Rosпотребнадзор. 25–27 May 2010. Obolensk: A-PRINT; 2010 (in Russian).
23. Yarkov SP, Shilenko IV, Skopinskaya SN, Zlobin VN. Kit for the detection of pathogens of dangerous diseases and toxins fluorescent immunochromatographic analysis. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2008; (2): 46–9 (in Russian).
24. Gorobets EA. Development of immunobiological preparations for the diagnosis of anthrax. *Dr. Biol. Sci [thesis]. Stavropol; 2009* (in Russian).
25. Dugarzhapova ZF, Radzihovskiy AV, Chesnokova MV, Balahonov SV, Boloshinov AB, Hanhareev SS, et al. Epizootic and epidemiological analysis of the situation on anthrax in the Republic of Buryatia (1995–2008). *Epidemiologiya Infektsionnye Bolezni* 2010; (6): 11–5 (in Russian).
26. Garanina SB, Tuchkov IV, Kulichenko AN, Kuklev EV, Pikalov IN. Using PCR with the locus to anthrax. In: *Abstracts of the 3rd All-Russian scientific-practical conference on 25–27 January 2000. Moscow; 2000* (in Russian).
27. Eremenko EI, Ryazanova AG, Tsygankova EA, Tsygankova OI, Kulichenko AN. Genotype peculiarities of *Bacillus anthracis* strains of different manifestation of symptoms associated with pathogenicity. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2010; (2): 53–6 (in Russian).
28. Chekanova TA, Kirdyashkina NP, Pudova EA, Sazhin AI, Sudyina AE, Markelov ML, Shipulin GA. Kits of reagents for the identification of causative agents of especially dangerous infections in immunochips format and DNA chips. *Proceedings of the V Annual All-Russian Congress on Infectious Diseases. Moscow; 2013. P. 441–2* (in Russian).
29. Yatsyshina SB, Obukhov IL, Kirillov LV, Salenko LS, Shmargun BI, Shipulin GA. Application of multiplex PCR for identification of virulent forms anthrax. *Proceedings of the IV All-Russian scientific-practical conference. Tver; 2002* (in Russian).
30. Abrashitova AS, Sayapina LV, Malahaeva AN, Osina NAa. Evaluating the effectiveness of a set of “Amplisens” reagents for indications of particularly dangerous infections by PCR in “real” time. *Zdorovie Naseleniya Sreda Obitaniya* 2013; (1): 32–4 (in Russian).
31. Tsygankova EA, Eremenko EI, Ryazanova AG, Tsygankova OI, Kulichenko AN. Multiplex PCR Test system for the detection of anthrax to the detection results in “real time” format. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; (1): 81–4 (in Russian).
32. Kutyrev VV, Smirnova NI. Molecular diagnostics and molecular typing of pathogens of plague, cholera and anthrax. *Molekularnaya Genetika, Mikrobiologiya, Virusologiya* 2003; (1): 6–14 (in Russian).
33. Tsygankova EA, Eremenko EI, Tsygankova OI, Ryazanova AG. Polymorphism of gene variants of protective antigen from *Bacillus anthracis* strains detected by PCR RFLP analysis. In: *Proceedings of the IX Interstate Scientific and Practical Conference of CIS member states. September 30 — October 2, 2008. Volgograd: VolgGMU; 2008* (in Russian).
34. Harrell LJ, Andersen GL, Wilson KH. Genetic variability of *Bacillus anthracis* and related species. *J Clin Microbiol.* 1995; 33(7): 1847–50.
35. Limanskaya OYu, Murtazayeva LA, Klee S, Limanskiy AP. Molecular technologies of anthrax detection by PCR of different formats. *Biotehnologiya* 2013; (3): 86–96 (in Russian).
36. Ezzell JW, Abshire T, Ibrahim S, Teska J, et al. Identification of *Bacillus anthracis*: an overview. *3rd International Conference on Anthrax. Plymouth, England, 7–10 Sept., 1998*.
37. Shishkova NA, Mokrievich AN, Platonov ME, Svetoch TE, Marinin LI. The study of genetic diversity of strains of the anthrax microbe collection of GNC PMB. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2010; (2): 60–5.
38. Ryazanova AG, Eremenko EI, Tsygankova OI, Tsygankova EA, Kulichenko AN. Application of *Bacillus anthracis* molecular typing methods by the Reference Center for the anthrax agent monitoring. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; (4): 68–70.
39. Amosov MYu, Kuznetsovskiy AV, Seroglazov VV, Savinyh AV, Onuchina NV, Vorobiev AA, et al. Identification and differentiation of microbial cultures of anthrax allocated to the Southern Federal District in May 2007. *Molekulyarnaya Meditsina* 2011; (6): 43–8 (in Russian).
40. Beyer W, Turnbull PCB. Anthrax in animals. *Molecular Aspects of Medicine* 2009; 30(6): 481–9.
41. Keim P, Price LB, Klevytska AM, Smith KL, Schupp JM, Okinaka R, et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol.* 2000; 182(10): 2928–36.
42. Ryazanova AG, Eremenko EI, Tsygankova OI, Tsygankova EA, Kulichenko AN. The use of molecular typing of *Bacillus anthracis* in the Reference Center for monitoring anthrax. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; (4): 68–70 (in Russian).

43. Rigvava S, Natidze M, Bubashvili M, Gogiashvili D, Vardzelashvili N. Identification of the *Bacillus anthracis* strains, isolated from different objects and serological diagnostics of anthrax. *Allergologiya Immunologiya* 2010; **2**(11): 123–5 (in Russian).
44. Golovinskaya TM, Buravtseva NP, Tsygankov OI, Eremenko EI. Comparative study of phage activity and specificity of the experimental series of anthrax bacteriophage Gamma A-26, K VIEV, BA-9 and BH-Fah IIVViM. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; (3): 28–30 (in Russian).
45. Zheludkova EV, Klimov VI, Byvalov AA, Ziganshin RSh, Kovtun VP. Improving the system of quality control of culture media used in microbiology. In: *Diagnosis, treatment and prevention of infectious diseases. Biotechnology. Veterinary Medicine. Mater. Yubileinoi nauch. konf.* 1998. P. 298–299.
46. Govorunova VA, Marinin LI, Mironova RI, Hramov MV, Mokrievich AN, Baranov AM. Diagnostic culture medium for the isolation and identification of anthrax. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; (2): 82–4 (in Russian).

## Authors

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 8–2 Petrovsky Boulevard, Moscow, 127051, Russian Federation.

*Sayapina LV.* Chief expert of Office of expertise of antibacterial medical immunobiological preparations of Center for examination and control of medical immunobiological preparations. Doctor of Medical Sciences.

*Bondarev VP.* Director of Center for examination and control of medical immunobiological preparations. Doctor of Medical Sciences, professor.

*Nikityuk NF.* Chief expert of Office of expertise of antibacterial medical immunobiological preparations of Center for examination and control of medical immunobiological preparations. Doctor of Medical Sciences, professor.

The Federal State Governmental Institution «294 Centre of Special Risk Rescue» of the Ministry of Emergency Situations of the Russian Federation. Musical passage, settlement of Mosrentgen plant, Moscow, 1427711, Russian Federation.

*Lobach RN.* Head of the group of biological protection.