DOI: 10.21055/0370-1069-2023-3-93-98

УДК 616.98:579.852.11

Ф.В. Логвин[1], О.В. Семенова[2], А.Г. Рязанова[2], И.В. Жарникова[2], Л.Ю. Аксенова[2], Д.В. Русанова[2], С.А. Курчева[2], О.Л. Старцева[2], А.С. Геогджаян[2], А.Н. Куличенко[2]

Оценка эффективности использования магноиммуносорбентов для селективного концентрирования спор возбудителя сибирской язвы

[1]ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет», Ростов-на-Дону, Российская Федерация;
[2]ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь, Российская Федерация

Цель исследования – оценка эффективности использования разработанных сибиреязвенных магноиммуносорбентов (МИС) для селективного концентрирования спор *Bacillus anthracis* и повышения чувствительности методов детекции возбудителя сибирской язвы, в том числе при исследовании проб почвы. **Материалы и методы.** Исследование проведено на 10 вакцинных штаммах *B. anthracis*, 30 штаммах близкородственных бацилл рода *Bacillus* (*B. cereus* – 15, *B. thuringiensis* – 10, *B. megaterium* – 5) с типичными видовыми свойствами. В работу были взяты три экспериментальные серии магноиммуносорбентов. Экстракцию ДНК и постановку ПЦР проводили согласно инструкции по применению набора реагентов для выявления ДНК *B. anthracis* «АмплиСенс *Bacillus anthracis*-FRT». **Результаты и обсуждение.** Показано, что при использовании МИС чувствительность культурального метода возрастает не менее чем в 7 раз (с учетом возможности сорбции на частице сорбента 1–10 и более спор). Чувствительность ПЦР-метода возрастает в 10 раз и составляет 50 спор *B. anthracis* в 1 мл для образцов, концентрированных на МИС. При исследовании искусственно контаминированных спорами *B. anthracis* проб почвы с использованием МИС чувствительность бактериологического метода возрастает в 7,5 раза. Таким образом, применение разработанных МИС позволяет существенно повысить чувствительность методов детекции возбудителя сибирской язвы и может рассматриваться в качестве эффективного способа пробоподготовки при исследовании объектов окружающей среды (почвы).

Ключевые слова: Bacillus anthracis, сибирская язва, диагностика, иммуномагнитные сорбенты, селективное концентрирование, полимеразная цепная реакция, лабораторная диагностика, исследование почвы.

Корреспондирующий автор: Семенова Ольга Викторовна, e-mail: anthraxlab.stv@mail.ru.

Для цитирования: Логвин Ф.В., Семенова О.В., Рязанова А.Г., Жарникова И.В., Аксенова Л.Ю., Русанова Д.В., Курчева С.А., Старцева О.Л., Геогджаян А.С., Куличенко А.Н. Оценка эффективности использования магноиммуносорбентов для селективного концентрирования спор возбудителя сибирской язвы. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2023; 3:93–98. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-3-93-98

Поступила 18.11.2022. *Принята к публ.* 01.03.2023.

F.V. Logvin[1], O.V. Semenova[2], A.G. Ryazanova[2], I.V. Zharnikova[2], L.Yu. Aksenova[2], D.V. Rusanova[2], S.A. Kurcheva[2], O.L. Startseva[2], A.S. Geogdzhayan[2], A.N. Kulichenko[2]

Assessment of the Effectiveness of Using Magnoimmunosorbents for the Selective Concentration of Anthrax Agent Spores

[1]Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation;
[2]Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Abstract. **The aim** of the study was to assess the effectiveness of the developed anthrax magnoimmunosorbents (MIS) for the selective concentration of *Bacillus anthracis* spores and to increase the sensitivity of anthrax agent detection techniques, including when testing soil samples. **Materials and methods.** We used 10 vaccine strains of *B. anthracis* and 30 strains of closely related bacilli of the genus *Bacillus* (*B. cereus* – 15, *B. thuringiensis* – 10, *B. megaterium* – 5) with typical species properties. The work was performed on three experimental batches of magnoimmunosorbents. DNA extraction and PCR setting was carried out in compliance with the instructions for reagent panel for *B. anthracis* DNA detection "ApliSens *Bacillus anthracis*-FRT". **Results and discussion.** It is shown that when using MIS, the sensitivity of the cultural method is increased by at least 7 times (taking into account the possibility of sorption of 1–10 or more spores on a sorbent particle). The sensitivity of the PCR method is improved by 10 times and amounts to 50 *B. anthracis* spores per 1 ml for the samples concentrated with the help of MIS. The sensitivity of the bacteriological method using MIS increases by a factor of 7.5 when testing the artificially contaminated with *B. anthracis* soil samples. Hence, application of the developed MIS makes it possible to significantly enhance the sensitivity of anthrax agent detection methods and can be considered as an effective means of sample preparation for the investigation of environmental objects (soil).

Key words: Bacillus anthracis, anthrax, diagnostics, immunomagnetic sorbents, selective concentration, polymerase chain reaction, laboratory diagnosis, studies of soil.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Funding: The work was carried out as part of the research project "Improving the methods of indication, identification of *Bacillus anthracis* and laboratory diagnosis of anthrax" under section 48.03 of the Sectoral Research Program of the Rospotrebnadzor for 2016–2020 "Problem-oriented scientific research in the field of epidemiological surveillance over infectious and parasitic diseases".

Corresponding author: Olga V. Semenova, e-mail: anthraxlab.stv@mail.ru.

Citation: Logvin F.V., Semenova O.V., Ryazanova A.G., Zharnikova I.V., Aksenova L.Yu., Rusanova D.V., Kurcheva S.A., Startseva O.L., Geogdzhayan A.S., Kulichenko A.N. Assessment of the Effectiveness of Using Magnoimmunosorbents for the Selective Concentration of Anthrax Agent Spores. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2023; 3:93–98. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2023-3-93-98
Received 18.11.2022. *Accepted* 01.03.2023.

Logvin F.V., ORCID: https://orcid.org/0000-0002-4410-1677
Semenova O.V., ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0274-898X
Ryazanova A.G., ORCID: https://orcid.org/0000-0002-5196-784X
Zharnikova I.V., ORCID: https://orcid.org/0000-0002-8443-4089
Aksenova L.Yu., ORCID: https://orcid.org/0000-0002-7744-3112
Rusanova D.V., ORCID: https://orcid.org/0000-0003-2229-6570
Kurcheva S.A., ORCID: https://orcid.org/0000-0002-3564-0791
Startseva O.L., ORCID: https://orcid.org/0000-0002-5493-5296
Geogdzhayan A.S., ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5563-8659
Kulichenko A.N., ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9362-3949

Bacillus anthracis принадлежит к группе *Bacillus cereus* рода *Bacillus*, которая объединяет *B. anthracis* и близкородственные бациллы *B. cereus* (*sensu stricto*), *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weichenstephanensis*, *B. wiedmannii*, *B. cytotoxicus*, *B. toyonensis*, *B. manliponensis*, *B. bingmayongensis*, *B. gaemokensis* [1]. Эти бациллы принадлежат к одной экологической нише, являясь почвенными микроорганизмами, и обладают значительной генетической и антигенной гомологией.

Споры *B. anthracis* характеризуются высокой устойчивостью к физическим и химическим воздействиям и поэтому обладают способностью длительно сохраняться в почве с формированием стойких почвенных очагов сибирской язвы, к которым в первую очередь относятся места захоронений павших животных.

В Российской Федерации насчитывается свыше 35 тыс. стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов, в которых учтено около 8 тыс. сибиреязвенных захоронений (СЯЗ) [2, 3]. Освоение новых территорий, строительство, разработка месторождений природных ресурсов, прокладка магистралей, выполнение других земляных работ на территориях с СЯЗ может привести к вспышкам сибирской язвы. Это обусловливает актуальность совершенствования методологий оценки эпидемиологической опасности СЯЗ [4].

Однако, как показывают исследования, частота обнаружения *B. anthracis* при исследовании почвы СЯЗ не превышает 3–4 % [5, 6]. Низкая частота выявления *B. anthracis* обусловлена неравномерным распределением возбудителя в СЯЗ и низкой концентрацией спор *B. anthracis* в пробах почвы. Сложность выделения *B. anthracis* из почвы также сопряжена с высоким уровнем содержания в пробах различных микроорганизмов, включая близкородственные бактерии рода *Bacillus* [7, 8]. Поэтому исследование почвы требует наличия высокоэффективных методов селективного концентрирования спор возбудителя. Один из перспективных методических подходов для прямого концентрирования микроорганизмов – иммуномагнитная сепарация, основанная на использовании магносорбентов с иммобилизованными на их поверхности лигандами (моноклональными и поликлональными антителами) [9–12]. Данный способ ранее показал свою эффективность при детекции возбудителей холеры и туляремии [13, 14]. Наиболее востребованным этот метод может быть при исследовании СЯЗ для определения их эпидемиологической опасности.

Цель работы – оценка эффективности использования магноиммуносорбентов (МИС) для селективного концентрирования спор *B. anthracis* и повышения чувствительности методов детекции возбудителя сибирской язвы, в том числе при исследовании проб почвы.

Материалы и методы

Исследование проведено на 10 вакцинных штаммах *B. anthracis*, 30 штаммах близкородственных бацилл рода *Bacillus* (*B. cereus* – 15, *B. thuringiensis* – 10, *B. megaterium* – 5) из коллекции ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора. Штаммы обладали типичными видовыми культурально-морфологическими, биохимическими и генетическими свойствами.

При выполнении бактериологического анализа использовали среды производства ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора: бульон Хоттингера (БХ), агар Хоттингера (АХ), агар Гладстона – Филдса, селективную дифференциально-диагностическую среду (СДДС) с динатриевой солью пара-нитрофенилфосфата (500 мг/л), цефтазидимом (20 мг/л), амфотерицином В (10 мг/л) (рН 7,2).

Для детекции ДНК *B. anthracis* методом ПЦР использовали набор реагентов «АмплиСенс *Bacillus anthracis*-FRT» (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия).

В работу были взяты три экспериментальные серии магноиммуносорбентов (1-21, 2-21, 3-21), полученные окислением сульфата железа (II) в присутствии нагретого гидроксида калия с формированием труднорастворимого соединения – гидроксида железа, обладающего сорбционными и магнитными свойствами. Ранее нами было показано, что применение в качестве лиганда иммуноглобулинов, выделенных каприловым методом из гипериммунной антиспоровой сыворотки, обеспечило специфичную адсорбцию спор из имитированных проб [15, 16].

При подготовке гомологичных (*B. anthracis*) и гетерологичных (близкородственные бациллы рода *Bacillus*) проб для определения количества спор в тестируемых образцах культур готовили рабочие разведения из взвесей спор, выращенных на агаре Гладстона – Филдса, по стандартному образцу мутности ОСО 42-28-85-2021 (10 МЕ); из разведений $1 \cdot 10^{-5}$, $1 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-7}$ делали высев по 100 мкл на чашки с АХ по три чашки на каждое разведение. Посевы выдерживали 18–20 ч при температуре 37 °С, затем подсчитывали количество выросших колоний и определяли количество спор.

С целью оценки уровня эффективности селективного концентрирования сибиреязвенных МИС проведены испытания с взвесями спор штаммов *B. anthracis* и близкородственных бацилл рода *Bacillus* в стерильной дистиллированной воде. Взвеси спор готовили во флаконах типа фалькон до конечной концентрации 10, 50, 100, 500 и 1000 спор в 1 мл (общий объем 10 мл). МИС добавляли в подготовленные взвеси спор из расчета 5 мкл на 1 мл пробы, перемешивали, инкубировали при температуре 37 °С в течение 15–20 мин. После этого при помощи дозатора удаляли воду из флакона, удерживая МИС на дне пробирки постоянным магнитом, добавляли 100 мкл дистиллированной воды. Для проведения бактериологического исследования МИС с сорбированными на них спорами из проб, содержащих 100 и 1000 спор в 1 мл, высевали на чашки с АХ по 100 мкл.

Контрольные образцы представляли из себя взвеси спор *B. anthracis* и близкородственных бацилл рода *Bacillus* в указанных концентрациях без добавления МИС, которые высевали на чашки с АХ по 100 мкл.

Для проведения ПЦР отмытые МИС в объеме 100 мкл из проб, содержащих 10, 50, 100, 500, 1000 спор/мл, с целью обеззараживания переносили в 0,9 мл БХ, инкубировали при 37 °С в течение 2,5 часов, затем добавляли свежеприготовленный раствор пенициллина (до конечной концентрации 1000 ед./мл) и инкубировали 15 мин при температуре 37 °С, далее пробы прогревали при 100 °С в течение 10 мин. Таким же образом готовили контрольные пробы без МИС. Экстракцию ДНК и постановку ПЦР проводили согласно инструкции по применению набора реагентов для выявления ДНК *B. anthracis* «АмплиСенс *Bacillus anthracis*-FRT».

На следующем этапе исследований тестировали эффективность селективного концентрирования сибиреязвенных МИС при работе с пробами почвы, искусственно контаминированными спорами возбудителя сибирской язвы. Для подготовки контаминированных проб в колбу помещали 100 г почвы, добавляли взвесь, содержащую 1000 спор *B. anthracis* (20 мл взвеси с концентрацией 50 спор/мл), перемешивали, оставляли при температуре окружающей среды на 18–24 ч. Далее в колбу с контаминированными пробами почвы вносили стерильную дистиллированную воду до конечного объема 10 мл. Перемешивали круговыми движениями в течение 5–10 мин, давали отстояться 5 мин, после чего надосадочную жидкость в объеме 10 мл переносили во флакон (типа фалькон), добавляли сибиреязвенные МИС и проводили пробоподготовку, как описано выше. Отмытые МИС в объеме 100 мкл высевали на питательные среды, исследовали методом ПЦР. В качестве контроля использовали искусственно контаминированные спорами *B. anthracis* пробы почвы без концентрирования на МИС.

Все эксперименты проводили в трех повторах.

Результаты и обсуждение

Полученные данные свидетельствуют о селективной сорбции спор *B. anthracis* на МИС. При посевной дозе 100 мкл из концентрации 100 спор/мл без МИС после инкубации при 37 °С в течение 18–20 ч в среднем вырастало 7 колоний, а после обработки с МИС – в среднем 48–50 колоний. При высеве 100 мкл из концентрации 1000 спор/мл без концентрирования на МИС вырастало в среднем 66 колоний, после инкубации с МИС – 490 (рис. 1).

При учете посевов опытных образцов взвесей спор близкородственных бацилл после инкубации с сибиреязвенными МИС выявлено, что споры большей части взятых в исследование штаммов сапрофитов (21 из 30 тестируемых) не сорбировались МИС. Девять штаммов близкородственных бацилл через 18–24 ч при 37 °С формировали рост единичных колоний на АХ после инкубации с МИС, что обусловлено значительной генетической гомологией и антигенным родством *B. anthracis* и близкородственных микроорганизмов рода *Bacillus*.

В результате проведенных экспериментов положительные результаты ПЦР получены с пробами после инкубации с МИС, содержащими споры сибиреязвенного микроба в концентрации 50 спор/мл, тогда как при постановке ПЦР с контрольными образцами (без концентрирования на МИС) ДНК *B. anthracis* выявлена при наличии не менее 500 спор сибиреязвенного микроба в 1 мл пробы (рис. 2).

В экспериментах по тестированию селективного концентрирования сибиреязвенных МИС с пробами почвы, искусственно контаминированными спорами штаммов возбудителя сибирской язвы при посеве на СДДС 100 мкл жидкости, полученной после пробоподготовки контаминированных образцов почвы, содержащих 1000 спор в 100 г пробы, с использованием МИС, и инкубации при 37 °С в течение 18–20 ч наблюдали рост в среднем 45 фосфатазонегативных колоний *B. anthracis* и единичные колонии почвенных бацилл (рис. 3).

В посевах контрольных контаминированных проб почвы без использования МИС на СДДС отмечен рост в среднем 6 колоний *B. anthracis* и обильный рост фосфатазопозитивных почвенных бацилл (рис. 4).

Получены положительные результаты при постановке ПЦР с пробами почвы, концентрированными на МИС; в контрольных образцах почвы (без использования МИС) ДНК *B. anthracis* не выявлена.

Таким образом, результаты исследования показали, что пробоподготовка путем предварительного избирательного концентрирования спор *B. anthracis* на сибиреязвенных МИС позволяет повысить чувствительность методов детекции *B. anthracis*, в том числе при исследовании почвенных образцов, характеризующихся высоким содержанием микроорганизмов, включающих близкородственные бациллы. В ходе лабораторных испытаний установлено, что при

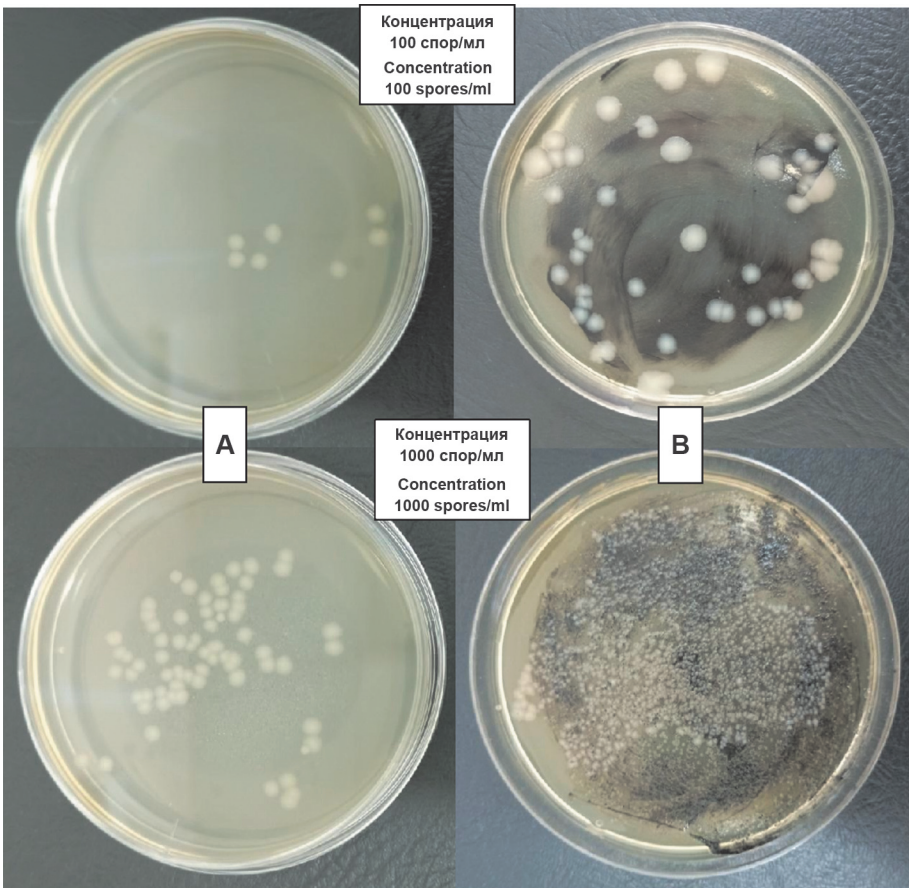

Рис. 1. Результат посева взвесей спор *B. anthracis* СТИ на АХ без применения МИС (А) и после инкубации с МИС (В)

Fig. 1. The results of seeding of *B. anthracis* STI spore suspensions on Hottinger's agar without magnoimmunosorbents (MIS) (A) and after incubation with MIS (B)

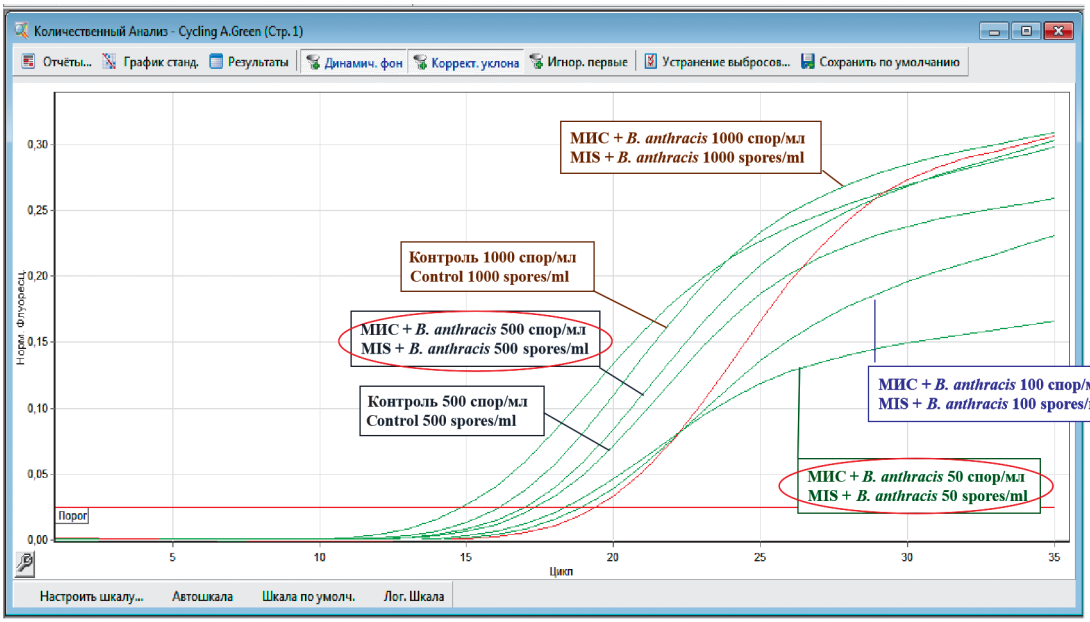

Рис. 2. Результаты оценки специфической активности (чувствительности) метода ПЦР при детекции проб *B. anthracis* СТИ в концентрациях 10–1000 спор/мл без применения МИС (контроль) и после инкубации с МИС

Fig. 2. Results of assessment of the specific activity (sensitivity) of PCR assay when detecting *B. anthracis* STI in concentrations of 10–1000 spores/ml without the use of MIS (control) and after incubation with MIS

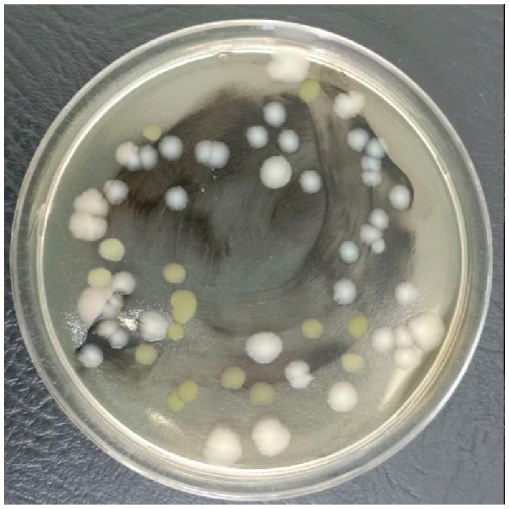

Рис. 3. Результат посева образца почвы, искусственно контаминированного спорами *B. anthracis*, на СДДС после сорбции на МИС (опыт)

Fig. 3. The result of seeding a soil sample, artificially contaminated with *B. anthracis* spores, on selective differential diagnostic medium (SDDM) after sorption on MIS (experiment)

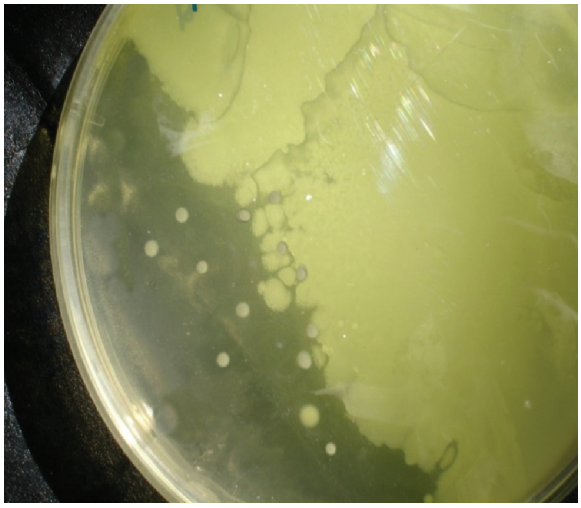

Рис. 4. Результат посева образца почвы, искусственно контаминированного спорами *B. anthracis*, на СДДС без применения МИС (контроль)

Fig. 4. The result of seeding a soil sample, artificially contaminated with *B. anthracis* spores, on SDDM without the use of MIS (control)

использовании МИС чувствительность бактериологического метода возрастает не менее чем в 7 раз, как при исследовании взвесей спор *B. anthracis*, так и образцов почвы, контаминированных спорами *B. anthracis*. При этом следует отметить, что на частицах МИС может сорбироваться различное количество спор (1–10 и более) и нет прямой корреляции между числом выросших колоний и количеством спор в пробе. Поэтому реальный уровень содержания спор в образце может быть на порядок выше.

Продемонстрировано, что для образцов, концентрированных на МИС, чувствительность метода ПЦР повышается в 10 раз и составляет 50 спор *B. anthracis* в 1 мл пробы. Результаты исследований позволяют сделать заключение, что использование МИС способствует выявлению *B. anthracis* в пробах почвы с концентрацией 1000 спор в 100 г (10 спор в 1 г) и более как при проведении бактериологического анализа, так и ПЦР.

Способность МИС к сорбции спор некоторых штаммов близкородственных бацилл не представляет проблему для лабораторной диагностики, поскольку сапрофиты исключаются из дальнейшего исследования по результатам комплекса идентификационных и дифференциально-диагностических бактериологических тестов, а использование ПЦР со специфичными для *B. anthracis* праймерами обеспечивает 100 % специфичность анализа.

Таким образом, очевидна перспективность практического применения данной технологии для повышения чувствительности лабораторного анализа при выявлении спор возбудителя сибирской язвы в объектах окружающей среды.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Финансирование. Работа выполнена в рамках научно-исследовательской работы «Совершенствование методов индикации, идентификации *Bacillus anthracis* и лабораторной диагностики сибирской язвы» раздела 48.03 Отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на 2016–2020 гг. «Проблемно-ориентированные научные исследования в области эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями».

Список литературы

1. Jung M.Y., Kim J.S., Paek W.K., Lim J., Lee H., Kim P.I., Ma J.Y., Kim W., Chang Y.H. *Bacillus manliponensis* sp. nov., a new member of the *Bacillus cereus* group isolated from foreshore tidal flat sediment. *J. Microbiol.* 2011; 49(6):1027–32. DOI: 10.1007/s12275-011-1049-6.

2. Черкасский Б.Л., редактор. Кадастр стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов Российской Федерации: Справочник. М.: ИНТЕРСЭН; 2005. 829 с.

3. Перечень скотомогильников (в том числе сибиреязвенных), расположенных на территории Российской Федерации. Информ. издание. М.: ФГБНУ «Росинформагротех»; 2011–2013.

4. Буравцева Н.П., Мезенцев В.М., Рязанова А.Г., Головинская Т.М., Дегтярев Д.Ю., Пазенко А.Н., Семенова О.В., Куличенко А.Н. Использование геоинформационных систем для создания электронной базы данных сибиреязвенных захоронений на территории Ставропольского края. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 4:31–6. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-31-36.

5. Черкасский Б.Л. Эпидемиология и профилактика сибирской язвы. М.: ИНТЕРСЭН; 2002. 384 с.

6. Симонова Е.Г., Картавая С.А., Локтионова М.Н., Ладный В.И. Эпидемиологическая опасность сибиреязвенных захоронений: теоретико-методологические аспекты. *Медицина в Кузбассе*. 2013; 12(2):26–31.

7. Рязанова А.Г., Еременко Е.И., Цыганкова О.И., Цыганкова Е.А. Усовершенствование методов идентификации атипичных штаммов возбудителя сибирской язвы и их дифференциация от близкородственных бацилл. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2009; 3:76–80.

8. Salgado J.R.S., Rabinovitch L., Gomes M.S., Allil R.C.D.S., Werneck M.M., Rodrigues R.B., Picão R.C., Oliveira Luiz F.B., Vivoni A.M. Detection of *Bacillus anthracis* and *Bacillus anthracis*-like spores in soil from state of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2020; 115:e200370. DOI: 10.1590/0074-02760200370.

9. Абгарян А.Г., Еременко Е.И., Ефременко В.И., Саркисова Н.В., Жарникова И.В., Афанасьев Е.Н., Жданова Е.В. Способ индикации возбудителя сибирской язвы в объектах внешней среды. Патент РФ № 2223499, опубл. 10.02.2004. Бюл. № 4.

10. Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н., Ляпустина Л.В., Коготкова О.И., Жарникова И.В., Ефременко В.И., Будыка Д.А., Василенко Н.Ф., Афанасьева Е.Е., Куличенко А.Н. Иммуномагнитные сорбенты для экспресс-диагностики опасных инфекционных заболеваний: аспекты биотехнологии и опыт применения. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2009; 3:59–61. DOI: 10.21055/0370-1069-2009-3(101)-59-61.

11. Жарникова Т.В., Жарникова И.В., Евченко Ю.М. Совершенствование биотехнологических процессов получения диагностических препаратов для выявления возбудителя туляремии с использованием иммобилизованных носителей. *Бактериология.* 2018; 3(1):55–8. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-55-58.

12. Цыганкова О.И., Еременко Е.И., Котенева Е.А., Буравцева Н.П., Воропаев В.В., Головинская Т.М., Семенова О.В., Рязанова А.Г. Сравнительная оценка эффективности лабораторных методов диагностики сибирской язвы и обнаружения ее возбудителя в объектах внешней среды. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(4):242–5. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-4-242-245.

13. Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н., Савельева И.В., Жарникова И.В., Жданова Е.В., Курчева С.А., Старцева О.Л., Куличенко А.Н. Разработка тест-систем магноиммуносорбентных для выявления холерного вибриона в объектах окружающей среды. *Здоровье населения и среда обитания*. 2014; 4:17–9.

14. Жарникова И.В., Ефременко В.И., Жарникова Т.В., Курчева С.А., Кальной С.М., Ефременко Д.В., Исакова А.А., Инденбом А.В. Серологические методы выявления возбудителя туляремии и их оценка. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2019; 4:32–8. DOI: 10.36233/0372-9311-2019-4-32-38.

15. Аксенова Л.Ю., Семенова О.В., Гаркуша Ю.Ю., Жданова Е.В., Курчева С.А., Еременко Е.И., Буравцева Н.П., Головинская Т.М., Варфоломеева Н.Г., Рязанова А.Г. Разработка и изучение специфичности магноиммуносорбентов для детекции споровой формы *Bacillus anthracis*. В кн.: Куличенко А.Н., редактор. Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных: Материалы III Всерос. науч.-практ. конф. с международным участием. Ставрополь: Экспо-Медиа; 2019. С. 143–4. [Электронный ресурс]. URL: https://snipchi.ru/updoc/2019/III%20Konferenziya.pdf.

16. Жарникова И.В., Геогджаян А.С., Семирчева А.А., Гаркуша Ю.Ю., Жданова Е.В., Курчева С.А., Русанова Д.В., Афанасьев Е.Н. Конструирование магнитного иммуносорбента для селективного концентрирования спор сибиреязвенного микроба. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова*. 2022; 18(2):13–8.

References

1. Jung M.Y., Kim J.S., Paek W.K., Lim J., Lee H., Kim P.I., Ma J.Y., Kim W., Chang Y.H. *Bacillus manliponensis* sp. nov., a new member of the *Bacillus cereus* group isolated from foreshore tidal flat sediment. *J. Microbiol.* 2011; 49(6):1027–32. DOI: 10.1007/s12275-011-1049-6.

2. Cherkassky B.L., editor. [Cadastre of Stationary Potentially Hazardous as regards Anthrax Areas of the Russian Federation. Reference Book]. Moscow: "INTERSEN"; 2005. 829 p.

3. [The list of cattle burial sites (including anthrax ones) located on the territory of the Russian Federation: Inform. edition]. Moscow: "Rosinformagrotekh"; 2011–2013.

4. Buravtseva N.P., Mezentsev V.M., Ryazanova A.G., Golovinskaya T.M., Degtyarev D.Yu., Pazenko A.N., Semenova O.V., Kulichenko A.N. [Use of geographic information systems for creation of electronic database of anthrax burial sites in the Stavropol Territory]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; (4):31–6. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-31-36.

5. Cherkassky B.L. [Epidemiology and Prevention of Anthrax]. Moscow: "INTERSEN"; 2002. 384 p.

6. Simonova E.G., Kartavaya S.A., Loktionova M.N., Ladny V.I. [Epidemiological hazard of anthrax burials: theoretical and methodological aspects]. *Meditsina v Kuzbasse [J. Medicine in Kuzbass]*. 2013; 12(2):26–31.

7. Ryazanova A.G., Eremenko E.I., Tsygankova O.I., Tsygankova E.A. [Improvement of methods for identification of atypical strains of the anthrax agent and their differentiation from closely related bacilli]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunology]*. 2009; (3):76–80.

8. Salgado J.R.S., Rabinovitch L., Gomes M.S., Allil R.C.D.S., Werneck M.M., Rodrigues R.B., Picão R.C., Oliveira Luiz F.B., Vivoni A.M. Detection of *Bacillus anthracis* and *Bacillus anthracis*-like spores in soil from state of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2020; 115:e200370. DOI: 10.1590/0074-02760200370.

9. Abgaryan A.G., Eremenko E.I., Efremenko V.I., Sarkisova N.V., Zharnikova I.V., Afanas'ev E.N., Zhdanova E.V. [The method of indication of the anthrax agent in environmental objects]. RF patent No. 2223499, publ. February 10, 2004 Bull. No. 4.

10. Tyumentseva I.S., Afanas'ev E.N., Lyapustina L.V., Kogotkova O.I., Zharnikova I.V., Efremenko V.I., Budyka D.A., Vasilenko N.F., Afanas'eva E.E., Kulichenko A.N. [Immune magnetic absorbents used for express diagnosis of dangerous infectious diseases: biotechnology aspects and experience of application]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2009; (3):59–61. DOI: 10.21055/0370-1069-2009-3(101)-59-61.

11. Zharnikova T.V., Zharnikova I.V., Evchenko Yu.M. [Improving biotechnological processes for production of diagnostic preparations for the detection of the causative agent of tularemia using immobilized carriers]. *Bakteriologiya [Bacteriology]*. 2018; 3(1):55–8. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-55-58.

12. Tsygankova O.I., Eremenko E.I., Koteneva E.A., Buravtseva N.P., Voropaev V.V., Golovinskaya T.M., Semenova O.V., Ryazanova A.G. [Comparative evaluation of the effectiveness of laboratory methods for anthrax diagnosis and the detection of its pathogen in environmental objects]. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika [Clinical Laboratory Diagnostics]*. 2016; 61(4):242–5. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-4-242-245.

13. Tyumentseva I.S., Afanas'ev E.N., Savel'eva I.V., Zharnikova I.V., Zhdanova E.V., Kurcheva S.A., Startseva O.L., Kulichenko A.N. [Development of magnoimmunosorbent test systems for the detection of *Vibrio cholerae* in environmental objects]. *Zdorov'e Naseleniya i Sreda Obitaniya [Public Health and Life Environment]*. 2014; (4):17–9.

14. Zharnikova I.V., Efremenko V.I., Zharnikova T.V., Kurcheva S.A., Kal'noy S.M., Efremenko D.V., Isakova A.A., Indenbom A.V. [Serological methods for detecting the causative agent of tularemia and their assessment]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2019; (4):32–8. DOI: 10.36233/0372-9311-2019-4-32-38.

15. Aksenova L.Yu., Semenova O.V., Garkusha Yu.Yu., Zhdanova E.V., Kurcheva S.A., Eremenko E.I., Buravtseva N.P., Golovinskaya T.M., Varfolomeeva N.G., Ryazanova A.G. [Development and study of the specificity of magnoimmunosorbents for the detection of the spore form of *Bacillus anthracis*]. In: Kulichenko A.N., editor. [Topical Issues of Diseases Common to Humans and Animals: Proceedings of the III All-Russian Scientific and Practical Conference with International Participation]. Stavropol: "Expo-Media"; 2019. P. 143–4. [Internet]. Available from: https://snipchi.ru/updoc/2019/III%20Konferenziya.pdf.

16. Zharnikova I.V., Geogdzhayan A.S., Semircheva A.A., Garkusha Yu.Yu., Zhdanova E.V., Kurcheva S.A., Rusanova D.V., Afanas'ev E.N. [Magnetic immunosorbent design for the selective concentration of spores of the anthrax microbe]. *[Bulletin of Biotechnology and Physical-Chemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov]*. 2022; 18(2):13–8.

Authors:

Logvin F.V. Rostov State Medical University. 29, Nakhichevansky Lane, Rostov-on-Don, 344022, Russian Federation. E-mail: okt@rostgmu.ru.

Semenova O.V., Ryazanova A.G., Zharnikova I.V., Aksenova L.Yu., Rusanova D.V., Kurcheva S.A., Startseva O.L., Geogdzhayan A.S., Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: stavnipchi@mail.ru.

Об авторах:

Логвин Ф.В. Ростовский государственный медицинский университет. Российская Федерация, 344022, Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29. E-mail: okt@rostgmu.ru.

Семенова О.В., Рязанова А.Г., Жарникова И.В., Аксенова Л.Ю., Русанова Д.В., Курчева С.А., Старцева О.Л., Геогджаян А.С., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: stavnipchi@mail.ru.