

ГЛАВА 3.5.11.

САП

РЕЗЮМЕ

*Сап - это контагиозное и смертельное заболевание лошадей, ослов и мулов, вызванное инфицированием бактерией *Burkholderia mallei*. Патогенный микроорганизм вызывает появление узелков и изъязвлений в верхних дыхательных путях и легких. Также встречается кожная форма болезни, известная под названием «фарси». Борьба с сапом носит комплексный характер, требуя тестирования подозрительных клинических случаев, скрининга предположительно здоровых животных из отряда непарнокопытных, а также элиминации животных с положительной реакцией. Поскольку *B. mallei* может передаваться человеку, любой явно, а также потенциально инфицированный или контаминированный материал, попадающий в лабораторию, требует обращения с должной биологической безопасностью и мерами биозащиты, следуя правилам анализа биологического риска.*

Идентификация возбудителя: *Мазки из свежего материала могут показать наличие грамотрицательных неспорообразующих, некапсулированных палочек. Электронная микроскопия продемонстрировала наличие у них капсулоподобной оболочки. Эти бактерии растут аэробно и предпочитают питательную среду, содержащую глицерин. *B. mallei* неподвижна в отличие от разновидностей *Pseudomonas* и близкородственной бактерии *B. pseudomallei*. Поступающие в продажу биохимические наборы для идентификации имеют недостаточную диагностическую чувствительность. Доступны специфические моноклональные антитела и полимеразная цепная реакция (ПЦР), а также анализы по методике ПЦР в режиме реального времени.*

Серологические тесты: *Реакция связывания комплемента (РСК) представляет собой точный и надежный серологический метод диагностического назначения. Твердофазный иммуоферментный анализ сулит хорошие перспективы по итогам его окончательного утверждения. Был разработан роз-бенгал тест агглютинации на пластинке. Чувствительным и специфичным анализом также является тест иммуноблоттинга на основе необработанного формалинового препарата антигенов *B. mallei*, полученных из штаммов разного географического происхождения.*

Маллеиновый тест: *Маллеиновый тест представляет собой пробу на аллергию против *B. mallei*. Обычно этот тест не рекомендуется из-за проблем, связанных с благополучием животных, однако он может быть полезен в отдаленных эндемических областях, где невозможны транспортировка или надлежащее охлаждение образцов анализируемого материала. Маллеин, водорастворимую белковую фракцию микроорганизма, вводят через внутрикожно-пальпебральную инъекцию. У инфицированных животных веко заметно набухает в течение 1-2 дней.*

Потребность в вакцинах и диагностических биопрепаратах: *Вакцин не существует. В настоящее время в продажу поступает очищенный белковый дериват маллеина.*

А. ВВЕДЕНИЕ

Сап представляет собой бактериальное заболевание непарнокопытных животных. Он имеет зоонозный потенциал и известен с древних времен. Возбудителем этого заболевания является бактерия *Burkholderia mallei* (ранее известная как *Pseudomonas*

mallei, Yabuuchi *et al.*, 1992), которую в прошлом классифицировали как *Pfeifferella*, *Loefflerella*, *Malleomyces* или *Actinobacillus*. Сап - это тяжелая инфекционная болезнь непарнокопытных, эпидемические вспышки которой также могут наблюдаться у животных из семейства кошачьих, живущих в дикой природе или в зоопарках. Восприимчивость к сапу была доказана у верблюдов, медведей, волков и собак. Хищники могут заражаться, поедая инфицированное мясо, но рогатый скот и свиньи резистентны к сапу. Мелкие жвачные животные могут заразиться при тесном контакте с больными лошадьми (Wittig *et al.*, 2006). У ослов и мулов сап обычно протекает в острой форме, сопровождаясь высокой температурой и респираторными проявлениями (раздутые ноздри, одышка, пневмония), а смерть наступает в течение нескольких дней. У лошадей сап обычно протекает менее остро, принимая хроническую форму, и больные животные могут выживать в течение нескольких лет. Хронические и субклинические «скрытые» случаи являются потенциальным источником инфекции из-за постоянного или перемежающегося выделения бактерий (Wittig *et al.*, 2006). Kahn *et al.* (2012) провели обзор данных по заболеванию, его эпидемиологии, диагностике и борьбе с ним.

У лошадей в раковинах и перегородках носовой полости развиваются воспалительные пустулы и язвы, давая начало липким желтым выделениям, сопровождающимся увеличенными и плотными подчелюстными лимфатическими узлами. Заживление язв сопровождается звездчатым рубцеванием. Формирование красноватых нодозных абсцессов с центральной серой некротической зоной в легких сопровождается прогрессирующей слабостью, эпизодами лихорадки, кашлем и одышкой. Также могут наблюдаться диарея и полиурия. При кожной форме («фарси»), увеличиваются лимфатические сосуды и развиваются нодозные абсцессы размером 0,5-2,5 см («почки»), которые изъязвляются, выделяя желтый маслянистый гной. Также могут развиваться сухие язвы. В печени и селезенке иногда обнаруживаются гнойно-гранулематозные узелки (Wernery *et al.*, 2012). Выделения из дыхательных путей и кожи контагиозны, обеспечивая передачу инфекции между животными, чему способствуют тесный контакт, вдыхание зараженного материала, его попадание внутрь (например, через инфицированный корм или воду в поилке), инокуляция (например, через упряжь). Инкубационный период может продолжаться от нескольких дней до многих месяцев (Wittig *et al.*, 2006).

Возможна передача сапа человеку через прямой контакт с больными животными или с инфицированным/контаминированным материалом. При нелеченом остром заболевании смертность может достигать 95% в течение 3 недель (Neubauer *et al.*, 1997). Однако возможно выживание, если зараженного человека начинают рано и агрессивно лечить с применением комплексной системной антибиотикотерапии. Может развиваться хроническая форма с абсцедированием (Neubauer *et al.*, 1997). При обращении с предположительно или заведомо инфицированными животными, а также фомитами (предметами, способными передавать инфекцию) должны быть приняты строгие меры предосторожности для предотвращения аутоинфекции или передачи бактерий. Лабораторные образцы необходимо надежно упаковывать, сохранять в холоде (не замораживая) и перевозить, как это в общих чертах описано в главе 1.1.3 *Транспортировка образцов животного происхождения*. Любые манипуляции с потенциально инфицированным/контаминированным материалом необходимо проводить, принимая соответствующие меры биологической безопасности на должном уровне предосторожности, определенном посредством анализа биологического риска (см. 1.1.4 *Биобезопасность и биосохранность: Стандарты управления биологическим риском в ветеринарной лаборатории и помещениях для содержания животных*).

Сап был искоренен во многих странах, благодаря законодательно установленному тестированию, выбраковке зараженных животных и ограничениям импорта. Он продолжает существовать во многих азиатских, африканских и южноамериканских странах, где его можно считать повторно возникающей инфекцией. Сап может быть занесен в области, свободные от этого заболевания, из-за миграционного передвижения непарнокопытных животных (Neubauer *et al.*, 2005).

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДИКИ

Таблица 1. Методы исследований, применяемые для диагностики сапа и их цель

Метод	Целевое назначение				
	Отсутствие инфекции в популяции	Отсутствие инфекции у отдельных животных	Вклад в политику искоренения	Подтверждение клинических случаев	Надзор за распространением инфекции
Идентификация возбудителя¹					
ПЦР	-	-	-	+	-
Культура	-	-	-	+	-
Обнаружение иммунного ответа					
Связывание комплемента	++	++ ²	+++	+	+++
Твердофазный ИФА	+	+	++	+	++
Малленнизация	+	+	+	+	+
Вестерн-блоттинг	+	+	++	+	++

Пояснение: +++ = рекомендованный метод; ++ = приемлемый метод; + = может быть использован в некоторых ситуациях, но применение существенно ограничено стоимостью, достоверностью или другими факторами; – = не подходит для данной цели; нп = не применимо.

Хотя не все тесты, относящиеся к категории +++ или ++ формально валидированы, они признаны приемлемыми по причине применения их в установившейся практике и широкого использования без неоднозначных результатов.

ПЦР = полимеразная цепная реакция; твердофазный ИФА = твердофазный иммуноферментный анализ.

1. Интерпретация тестов для диагностики сапа

Подтверждение диагноза сапа должно быть основано на выделении и идентификации *Burkholderia mallei* в образце от непарнокопытного животного или продукте, полученном от этого животного; либо на идентификации в таких образцах антигена или генетического материала, специфичного для *B. mallei*. Поддерживающие доказательства могут быть получены при положительных результатах серологических тестов, таких как титр 1/5 в реакции связывания комплемента (РСК), подтвержденный вторым тестом с такой же или более высокой чувствительностью и более высокой специфичностью, например, специфичным для *B. mallei* липосахаридным (ЛПС) вестерн-блоттингом, И-ИФА (непрямым твердофазным иммуноферментным анализом), основанным на рекомбинантном белке из системы секреции типа VI, или К-ИФА (конкурентным ИФА), основанным на моноклональных антителах, специфичных для *B. mallei*.

2. Идентификация возбудителя

Случаи для специфического исследования на сап надо дифференцировать по клиническим признакам от других хронических инфекций, поражающих слизистые

¹ Для анализа клинического образца рекомендуется использовать сочетание методов идентификации возбудителя.

² Только лошадиные образцы – при интерпретации результатов теста на ослиных образцах нужна осторожность.

оболочки носа или носовые пазухи. К ним относятся мыт (*Streptococcus equi*), язвенный лимфангит (*Corynebacterium pseudotuberculosis*), псевдотуберкулез (*Yersinia pseudotuberculosis*) и споротрихоз (подвиды *Sporotrichium*). Сап необходимо исключать при анализе подозрительных случаев эпизоотического лимфангита (*Histoplasma farciminosum*), с которым сап проявляет некоторое клиническое сходство. У человека сап, в особенности, следует дифференцировать с мелиоидозом (ложным сапом), вызываемым *B. pseudomallei*, бактерией, близкородственной *B. mallei*.

2.1. Морфология *Burkholderia mallei*

Микроорганизмы довольно многочисленны в мазках из свежих повреждений, но скудны в материале из других повреждений. Мазки принято окрашивать метиленовым синим или красителем Грама. Грамотрицательные палочки имеют округленные концы, длину 2-5 мкм и ширину 0,3-0,8 мкм, а также содержат гранулярные включения различного размера. Бактерии обычно расположены внеклеточно и часто бывают нерегулярно и плохо окрашены при использовании красителя Грамма. При осмотре под оптическим микроскопом они не имеют явно видимой капсулы и не образуют спор. Электронная микроскопия подтвердила наличие капсулоподобной оболочки. Эта капсула состоит из нейтральных углеводов и служит для защиты клетки от неблагоприятных факторов окружающей среды. *B. mallei*, в отличие от других микроорганизмов группы *Pseudomonas* и ее близкого родственника *B. pseudomallei*, не имеет жгутиков и поэтому остается неподвижной (Sprague & Neubauer, 2004). Неподвижность - это самая важная в диагностическом плане фенотипическая характеристика, которая должна быть продемонстрирована в чистой бактериальной культуре. Микроорганизмы трудно обнаружить в тканевых срезах, где они могут иметь четкообразный вид. В культуральной среде они могут иметь разный внешний вид в зависимости от возраста культуры и типа питательной среды, причем в стареющих культурах они проявляют большой плеоморфизм. На поверхности бульонных культур формируются ветвящиеся нити (Neubauer *et al.*, 2005).

2.2. Культуральные характеристики

Предпочтительны попытки выделения бактерий из закрытых повреждений, не контаминированных посторонним материалом. Микроорганизм является аэробным и факультативно анаэробным только в присутствии нитрата, давая оптимальный рост при температуре 37°C. На культуральной среде, включающей овечий кровяной агар, он растет хорошо, но медленно. Рекомендуется 72-часовая инкубация культур; особенно полезно обогащение глицерином. Крошечные сероватые блестящие колонии *B. mallei* на овечьем кровяном агаре могут легко зарастать другими бактериями; поэтому необходимо вести тщательное наблюдение, чтобы не пропустить нужные бактерии после 72-часовой инкубации. После нескольких дней культивирования на глицериновом агаре можно наблюдать сливающуюся, гладкую, влажную и немного вязкую бактериальную культуру кремового цвета. При длительной инкубации культура бактерий утолщается и становится темно-коричневой и плотной. *Burkholderia mallei* также хорошо растет на картофельном агаре с глицерином и в бульоне с глицерином, на котором образуется слизистая пленка. Рост культуры на питательном агаре намного менее экспансивен, а на желатине довольно плох. Рост культуры *B. mallei* обеспечивают различные поступающие в продажу селективные агары *Burkholderia* (Glass *et al.*, 2009). Даже в свежих образцах, полученных в стерильных условиях культура *B. mallei* часто зарастает другими бактериями, что делает выделение возбудителя чрезвычайно трудным (Wernery, 2009).

Подтверждение идентичности подозреваемых изолятов осуществляют посредством биохимических реакций или полимеразной цепной реакции (ПЦР). Характеристики бактериальной культуры могут измениться *in vitro*, поэтому для реакций

идентификации надо использовать свежие изоляты. Положительные биохимические реакции включают редукцию нитратов, утилизацию аргинина аргининовой дигидролазой, ассимиляцию глюкозы, N-ацетилглюкозамина и глюконата. В реакциях ассимиляции арабинозы, фруктозы, маннозы, маннита, адипиновой кислоты, малата, тринатрийцитрата, фенилуксусной кислоты и реакции Фогеса-Проскауэра, для которой требуется 48-часовая инкубация, наблюдается вариабельность от штамма к штамму. В бактериальных культурах не вырабатываются индол и диффундирующие пигменты, а лошадиная кровь не гемолизируется. Для подтверждения принадлежности микроорганизма к группе *Pseudomonas* могут быть использованы имеющиеся в продаже лабораторные системы биохимической идентификации. Однако, в целом, имеющиеся в продаже системы непригодны для однозначной идентификации членов постоянно растущего числа видов в роде *Burkholderia* (Glass & Popovic, 2005). Следовательно, утрата подвижности имеет особую значимость. Доступен бактериофаг, специфичный для *B. mallei*.

Все приготовленные культуральные среды должны проходить контроль качества и обеспечивать рост подозрительного микроорганизма из небольшого количества посевного материала. Параллельно с подозрительными образцами необходимо культивировать эталонный штамм, чтобы подтвердить правильное функционирование тестов.

При исследовании контаминированных образцов оказалось полезным дополнять питательную среду веществами, подавляющими рост грамположительных микроорганизмов (например, красителем кристаллический фиолетовый, профлавином), а также проводить предварительную обработку пенициллином (1000 единиц/мл в течение 3 часов при 37°C). Была разработана полуселективная среда (Xie *et al.*, 1980) состоящая из полимиксина Е (1000 единиц), бацитрацина (250 единиц), и актидиона (0,25 мг), включенных в питательный агар (100 мл), содержащий глицерин (4%), ослиную или лошадиную сыворотку (10%), а также овечий гемоглобин или триптонный агар (0,1%). Сильно контаминированные образцы также следует нанести полосами на застывший кровяной агар (3-процентный агар), подавляющий рост видов *Proteus*, и на декстрозный агар Сабуро, подавляющий рост многих грамположительных и грамотрицательных бактерий в образцах, исследуемых на сап. Такие образцы также следует наносить полосами на кровяной агар и инкубировать анаэробно в течение 24 часов, чтобы подавить рост облигатных аэробов. При выделении *B. mallei* из анаэробных планшетов нужна дополнительная инкубация в течение 24 часов при 37°C. При тестировании контаминированных образцов также могут оказаться полезными методы ПЦР.

Вне тела хозяина микроорганизм малоустойчив к высушиванию, нагреванию, свету или химическим веществам, поэтому его выживание более 2 недель маловероятно (Neubauer *et al.*, 1997). Однако при благоприятных условиях, он, вероятно, может выжить в течение нескольких месяцев. *Burkholderia mallei* может сохранять жизнеспособность в водопроводной воде, по меньшей мере, в течение 1 месяца. Было показано, что для дезинфекции очень эффективны бензалконий хлорид (1/2000), гипохлорит натрия (500 частей на миллион активного хлора), йод, хлористая ртуть в спирте и перманганат калия. Фенольные дезинфицирующие средства менее эффективны (St. Georgiev, 2008). В соответствующих странах должны соблюдаться руководства по обращению с дезинфицирующими средствами и их применению.

2.3. Идентификация *Burkholderia mallei* посредством полимеразной цепной реакции и ПЦР в режиме реального времени

Были разработаны несколько аналитических методик ПЦР и ПКТ в режиме реального времени для идентификации *B. mallei* были развиты (Lee *et al.*, 2005; Sprague *et al.*, 2002; Thibault *et al.*, 2004; Ulrich *et al.*, 2006; U'Ren *et al.*, 2005), но прошли оценку только одна обычная методика ПЦР и одна методика ПЦР в режиме реального времени при использовании образцов, полученных в недавней вспышке сапа у лошадей (Scholz *и др.*, 2006; Tomaso *et al.*, 2006). Поэтому две проверенные методики будут описаны более подробно, но необходимы дополнительные межлабораторные исследования для подтверждения надежности этих анализов. Необходимо соблюдать руководящие указания и меры предосторожности, описанные в общих чертах в главе 1.1.6 *Принципы и методы валидации диагностических наборов для анализа инфекционных заболеваний*.

2.3.1. Приготовление ДНК

Единичные колонии переносят из планшета с агаром в 200 мкл деионизированной воды. После термической инактивации (например, при 99°C в течение 30 минут), можно провести выделение ДНК с применением имеющихся в продаже наборов, рассчитанных на получение ДНК для грамотрицательных бактерий (см. Scholz *et al.*, 2006 и Tomas *et al.*, 2006). В альтернативном варианте можно непосредственно использовать для ПЦР термически инактивированные бактерии из чистых культур (например, при 99°C в течение 10 минут).

Тканевые образцы от лошадей (кожа, легкие, слизистая оболочка носовых раковин и перегородок, печень и селезенка), которые были инактивированы и сохранены в формалине (48 часов, 10% в объемном отношении) разрезают скальпелем на кусочки размером 0,5×0,5 см (приблизительно 500 мг). Экземпляры дважды отмывают в деионизированной воде (10 мл), инкубируют в течение ночи в стерильном солевом растворе при 4°C и измельчают, замораживая в жидком азоте с последующим растиранием в ступке пестиком. Тотальную ДНК выделяют из 50 мг ткани, используя имеющийся в продаже набор для выделения в соответствии с инструкциями производителя. ДНК элюируют в 80 мкл dH₂O или в соответствии с используемым набором.

2.3.2. Методика ПЦР (Scholz *et al.*, 2006)

Анализ желателно адаптировать к инструменту ПЦР, применяемому с минимальными модификациями по условиям цикла и концентрации используемых реактивов.

Олигонуклеотиды, используемые Scholz *et al.*, (2006), основаны на различиях между последовательностями *fliP* *B. mallei* ATCC 23344^T (инвентарные номера NC_006350, NC_006351) и *B. pseudomallei* K96243 (инвентарные номера NC_006348, NC_006349). Для амплификации фрагмента длиной 989 bp (пар оснований) используют праймеры Vma-IS407-flip-f (5'-TCA-GGT-TTG-TAT-GTC-GCT-CGG-3') и Vma-IS407-flip-r (5'-СТА-GGT-GAA- GCT-CTG-CGC-GAG-3'). ПЦР использует 50 мкл готовой к работе смеси типа мастер-микс, 15 пкмоль каждого праймера и 4 мкл матричной ДНК. Условия термоциклирования соответствуют 94°C в течение 30 секунд, затем 35 циклов при 65°C в течение 30 секунд и при 72°C в течение 60 секунд с последующим этапом финальной элонгации при 72°C в течение 7 минут. Визуализация продуктов происходит под УФ светом после электрофореза в агарозном геле (1% в отношении веса к объему в буфере Трис-ацетат-ЭДТА) и окрашивания красителем для нуклеиновых кислот. В каждый запуск ПЦР включают безматричные средства контроля, содержащие вместо матрицы воду ПЦР-класса, и средства позитивного контроля, содержащие ДНК *B. mallei*, чтобы можно было обнаружить контаминацию ампликонами предыдущих запусков или отказ амплификации.

Нижний предел обнаружения в этом анализе составляет 10 фг или 2 геномных эквивалента.

2.3.3. Методика ПЦР в режиме реального времени (Tomaso *et al.*, 2006)

Анализ следует адаптировать к используемому инструменту ПЦР в режиме реального времени, например, пробирки для циклирования надо подбирать в соответствии с рекомендациями производителя, желательнее увеличить концентрацию олигонуклеотидов или изменить мечение зондов.

Олигонуклеотиды, используемые Tomaso *et al.* (2006), основаны на различиях между последовательностями *fliP* *B. mallei* ATCC 23344^T (инвентарные номера NC_006350, NC_006351) и *B. pseudomallei* K96243 (инвентарные номера NC_006348, NC_006349). Синтезируют флуорогенный зонд с 6-карбоксихлоресцеином (FAM) на 5'-конце и гаситель флуоресценции типа «черная дыра» 1 (BHQ1) на 3'-конце. Были использованы олигонуклеотиды Bma-flip-f (5'-CCC-ATT-GGC-CCT-ATC-GAA-G-3'), Bma-flip-r (5'-GCC-CGA-CGA-GCA-CCT-GAT-T-3') и зонд Bma-flip (5'-6FAM-CAG-GT C-AAC-GAG-CTT-CAC-GCG-GAT-C-BHQ1-3').

Реакционная смесь объемом 25 мкл состоит из 12,5 мкл 2Ч смеси типа мастер-микс, 0,1 мкл каждого праймера (10 пкмоль/мкл), 0,1 мкл зонда (10 пкмоль/мкл) и 4 мкл матричной ДНК. Условия термоциклирования соответствуют 50°C в течение 2 минут; 95°C в течение 10 минут; 45 циклов при 95°C в течение 25 секунд и 63°C в течение 1 минуты. Возможное контаминирование продуктами амплификации из предыдущих реакций инактивируют посредством начального этапа инкубации, используя урацил-N-гликозилазу.

Авторы предлагают включить внутренний контроль ингибирования, основанный на целевом гене бактериофага лямбда (Lambda-F [5'-ATG-CCA-CGT-AAG-CGA-AAC-A-3] Lambda-R [5'-GCA-TAA-ACG-AAG-CAG-TCG-AGT-3'], Lam-YAK [5'-YAK-ACC-TTA-CCG-AAA-TCG-GTA-CGG-ATA-CCG-C-DB-3']), который можно титровать, чтобы обеспечить воспроизводимые пороговые характеристики цикла. Однако в зависимости от материала образца дополнительно или в качестве альтернативы можно использовать ПЦР, нацеленную на конститутивный ген. В каждый запуск ПЦР включают безматричные средства контроля, содержащие вместо матрицы 4 мкл воды ПЦР-класса, и средства позитивного контроля, содержащие ДНК *B. mallei*, чтобы можно было обнаружить ампликонную контаминацию отказ амплификации.

Линейный диапазон анализа был определен в интервале концентраций от 240 пг до 70 фг бактериальной ДНК на реакцию. Нижний предел обнаружения был определен как минимальное количество ДНК, последовательно обнаруженное в трех запусках ПЦР с восемью измерениями, каждое из которых соответствует 60 фг ДНК или четырем геномным эквивалентам (вероятность 95%). Вариативность результатов одного анализа *fliP* ПЦР составляет 0,68% для 35 пг ДНК на реакцию (на основе значений Ct) и 1,34% для 875 фг, соответственно. Вариативность результатов в серии анализов составляет 0,89% для 35 пг ДНК на реакцию (на основе значений Ct) и 2,76% для 875 фг ДНК, соответственно.

В настоящее время положительный результат ПЦР в режиме реального времени подтверждает диагноз «*Burkholderia mallei*» для бактериального изолята и диагноза «сап» в клинических случаях. Однако надо иметь в виду, что генетическая эволюция в будущем может привести к появлению клонов *B. mallei*, которые не смогут обнаружить эти стандартные методики ПЦР. Чувствительность анализов ПЦР применительно к клиническим образцам неизвестна. Следовательно, отрицательный результат не

доказывает отсутствие *B. mallei* в образце, то есть, для подтверждения этого результата надо применять другие диагностические средства.

2.4. Другие методы

Такие методики молекулярного типирования, как ПЦР-полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (Tanpiboonsak *et al.*, 2004), гель-электрофорез в пульсирующем поле (Chantratita *et al.*, 2006), риботипирование (Harvey & Minter, 2005) или мультилокусное секвенирование (МЛС) (Godoy *et al.*, 2003) подходят для применения только в специализированных лабораториях.

3. Серологические тесты

3.1 Реакция связывания комплемента у лошадей, ослов и мулов

РСК представляет собой точный серологический тест, который уже много лет используется для диагностики сапа. Этот анализ может давать положительные результаты не позже 1 недели после инфицирования, а также распознавать сыворотки при обострении в хронических случаях. Для этого теста крайне важно применение строгого контроля качества в технологии приготовления антигенов для РСК, комплемента и гемолитических систем, поскольку его специфичность и чувствительность критически зависят от используемого антигена. (Elschner *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2011). Однако недавно специфичность РСК была подвергнута сомнению (Neubauer *et al.*, 2005). РСК применима к лошадям, мулам и верблюдам, но при ее использовании у ослов необходимо особое внимание, чтобы избежать ошибочного диагноза.

3.1.1. Приготовление антигена

i) Штамм исходной культуры *B.mallei*, сохраненный при температуре -80°C , восстанавливают, высевая на овечий кровяной агар и инкубируют при 37°C в течение 48 часов для получения сплошного роста.

ii) Из этой 48-часовой культуры петлей для посева (диаметром 0,5 мм) делают посев в 5 мл бульона с сердечно-мозговым экстрактом (ВН) с 3% глицерина и инкубируют при 37°C в течение 24 часов.

iii) 1 мл вышеупомянутого культурального бульона далее инокулируют в 100 мл бульона ВН с 3% глицерина и инкубируют при 37°C в течение 48 часов при легком перемешивании.

iv) Культуры инактивируют, подвергая флаконы воздействию текучего пара (100°C) в течение 60 минут.

v) Прозрачную надсадочную жидкость сливают и фильтруют. Фильтрат снова нагревают свежим паром в течение 1 часа и осветляют центрифугированием на скорости 3000 об/мин в течение 10 минут.

vi) Осветленный продукт, как концентрат антигена, помещают в коричневые стеклянные флаконы, защищая от света и хранят при 4°C . Было показано, что антиген в этом концентрированном состоянии остается стабильным в течение, по меньшей мере 10 лет.

vii) Аликвоты антигена готовят, разбавляя концентрированный антиген в соотношении 1/20 стерильным физиологическим раствором, содержащим 0,5% фенола. Разбавленный антиген разливают в коричневые стеклянные флаконы и хранят при 4°C . Конечное

рабочее разведение определяют блочным титрованием. Конечное рабочее разведение для РСК готовят непосредственно перед проведением теста.

Полученный в результате антиген состоит, прежде всего, из липосахаридов (ЛПС). В альтернативной процедуре используют молодые культуры, выращивая их на скошенном агаре с глицерином не более 48 часов и отмывая нормальным физиологическим раствором. Суспензию культуры нагревают в течение 1 часа при 70°C, и термообработанную бактериальную суспензию используют в качестве антигена. Недостаток этого метода приготовления антигена заключается в том, что антиген содержит все компоненты бактериальной клетки. Антиген необходимо проверять на безопасность, высевая материал в чашки с кровяным агаром.

3.1.2. Процедура РСК

i) Сыворотку разбавляют в соотношении 1/5 забуференным физиологическим раствором с вероналом (барбитуратом), содержащим 0,1% желатина (VBSG) или разбавителем для связывания комплемента (CFD), доступном в виде таблеток без желатина или других имеющихся в продаже буферов для РСК.

ii) Разбавленную сыворотку инактивируют в течение 30 минут при 58-60°C. Сыворотку других непарнокопытных животных (не лошадей) необходимо инактивировать при 63°C в течение 30 минут. Верблюжью сыворотку инактивируют в течение 30 минут при 56°C.

iii) Двукратные разведения сывороток готовят, используя вероналовый буфер или, в качестве альтернативы, имеющиеся в продаже буферы для РСК в 96-луночных микротитрационных планшетах со скругленным дном.

iv) Комплемент морской свинки разбавляют в выбранном буфере и используют 4 или 5 пятидесятипроцентных гемолитических единиц комплемента (CH₅₀).

v) Сыворотки, комплемент и антиген смешивают в чашках и инкубируют в течение 1 часа при 37°C. В альтернативном варианте проводят ночную инкубацию при 4°C.

vi) Добавляют 2-3% суспензию сенсibilизированных отмытых овечьих эритроцитов.

vii) Чашки инкубируют в течение 45 минут при 37°C, а затем центрифугируют 5 минут с ускорением 600 g.

При использовании имеющихся в продаже антигенов для РСК и готовых к применению реактивов для РСК необходимо выполнять инструкции производителей.

Рекомендуемые средства контроля для верификации условий теста:

i) Положительный контроль: контрольная сыворотка, дающая положительную реакцию;

ii) Отрицательная контрольная сыворотка: контрольная сыворотка, дающая отрицательную реакцию;

iii) Антикомплемтарный контроль (сывороточный контроль): разбавитель + инактивированная испытуемая сыворотка + комплемент + гемолитическая система;

iv) Контроль антигена: разбавитель + антиген + комплемент + гемолитическая система;

v) Контроль гемолитической системы: разбавитель + гемолитическая система;

vi) Контроль комплемента: разбавитель + титрование комплемента + антиген + гемолитическая система;

3.1.3. Считывание результатов

Отсутствие антикомплементарной активности необходимо проверять для каждой сыворотки; антикомплементарные сыворотки исключают из анализов. Образец, который производит 100%-ный гемолиз при разведении 1/5, считается отрицательным, 25-75%-ный гемолиз считается подозрительным, а отсутствие гемолиза (100%-ная фиксация) считается положительным результатом. Могут наблюдаться ложноположительные результаты, а животные могут оставаться положительными в течение месяцев. Кроме того, *B. pseudomallei* и *B. mallei* реагируют перекрестно и их невозможно дифференцировать серологически (Neubauer *et al.*, 1997). Здоровые непарнокопытные после внутрикожного маллеинового теста могут показывать ложноположительную РСК в течение неопределенного промежутка времени.

3.2. Твердофазные иммуноферментные анализы

Для серодиагностики сапа были использованы как чашечные, так и мембранные ИФА, но ни одна из этих процедур оказалась неспособной дифференцировать *B. mallei* от *B. pseudomallei*. Описан точечный авидин-биотиновый ИФА, который пока не был аттестован и не получил широкого применения. В качестве антигена используют концентрированную и очищенную термически инактивированную бактериальную культуру. Пятно этого антигена наносят на нитроцеллюлозный уровнемер. Используя предварительно заблокированные уровнемеры с нанесенным антигеном, можно полностью выполнить тест приблизительно за 1 час. Было показано, что I-ИФА имеет ограниченное значение для серологической диагностики сапа (Sprague *et al.*, 2009). I-ИФА на основе рекомбинантного белка А внутриклеточной подвижности *Burkholderia* (rVimA) показал многообещающую чувствительность на уровне 100% и специфичность 98,88% (Kumar *et al.*, 2011). Также был разработан С-ИФА, в котором используется неохарактеризованное моноклональное антитело против ЛПС, причем его производительность аналогична таковой для РСК (Katz *et al.*, 2000). С-ИФА снова использовали на панели лошадиных сывороток, происходящих, главным образом, из ближневосточных стран (Sprague *et al.*, 2009). Недавно был разработан С-ИФА для продажи, в котором используется моноклональное антитело против ЛПС *B. mallei* наряду с антигеном, полученным из регионального изолята *B. mallei*. Он показал более высокую чувствительность по сравнению с РСК в идентификации полевых случаев. С-ИФА проходил оценку на ослиных сыворотках, и в этом инфекционном исследовании были получены надежные результаты. Продолжение разработки реактивов моноклональных антител, специфичных для антигенных компонентов *B. mallei*, откроет новые возможности для создания более специфичных ИФА, что поможет решить сомнительные вопросы по результатам тестирования импортных лошадей, проходящих карантин (Neubauer *et al.*, 1997).

Ни один из этих тестов не прошел полную аттестацию до настоящего времени.

3.3. Аналитические методики иммуноблоттинга

Для серодиагностики сапа был разработан анализ методом иммуноблоттинга, но его дальнейшая аттестация оказалась невозможной из-за отсутствия положительной контрольной панели сывороток (Katz *et al.*, 1999). Недавно разработка иммуноблоттинга была возобновлена с использованием антигена ЛПС *B. mallei*. Цель состояла в том, чтобы получить более чувствительный тест по сравнению с РСК для повторной проверки ложноположительных результатов РСК при исследовании сывороток в неэндемических областях (Elschner *et al.*, 2011). Разработанный анализ основан на неочищенных препаратах антигена *B. mallei* штаммов Bogor, Zagreb и Mukteswar,

которые также являются основой для большинства рецептур антигена, используемых в РСК. Антигены сепарируют в процедуре SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия), а затем переносят на нитроцеллюлозные мембраны. Антитела против ЛПС *B. mallei* в образце сыворотки, реагирующем на антиген на блот-полосе, визуализируют при помощи видоспецифичного сопряженной (фосфатазного) конъюгата и цветовой системы NBT-BCIP (нитросиний тетразолий-5-бromo-4-хлоро-3-индоил-фосфат). Иммуноблоттинг считают положительным, если четко виден характер лестничной исчерченности ЛПС *B. mallei* в регионе 20-60 кДа, подозрительным, если обнаружена слабая цветная реакция, и отрицательным, если не видна никакая реакция. Были исследованы 171 сыворотка пораженных сапом лошадей и мулов из Пакистана и Бразилии и 305 сывороток здоровых немецких лошадей, причем все сап-положительные и сап-отрицательные животные были диагностированы правильно. Этот тест неспособен дифференцировать сап от инфекционного мелиоидоза (ложного сапа), и до сих пор не был аттестован для использования у ослов из-за отсутствия значительного количества положительных контрольных сывороток.

3.4. Другие серологические тесты

Для диагностики сапа у лошадей и других восприимчивых к этой инфекции животных был описан роз-бенгал тест агглютинации на пластинке (РБТ), который официально утвержден в России. В исследовании, проведенном в Пакистане, РБТ показал чувствительность 90% и специфичность 100% (Naureen *et al.*, 2007). Антиген представляет собой термоинактивированную бактериальную суспензию, окрашенную бенгальским розовым, красителем, который используют в этом тесте.

Точность других тестов агглютинации и преципитации для программ контроля неудовлетворительна. Лошади с хроническим сапом и в ослабленном состоянии дают отрицательные или неубедительные результаты.

4. Тесты на клеточный иммунитет

4.1. Маллеиновый тест

Маллеин, очищенный белковый дериват (ОБД), который имеется в продаже, представляет собой раствор водорастворимых белковых фракций термообработанных бактерий *B. mallei*. См. раздел С ниже, где подробно описаны его приготовление и доступность. Этот тест обычно не рекомендуется из-за проблем, связанных с благополучием животных, однако он может быть полезен в отдаленных эндемических областях, где невозможны транспортировка образцов или их надлежащее охлаждение. Он зависит от инфицированных лошадей, гиперчувствительных к маллеину. Запущенные клинические случаи у лошадей, а также острые случаи у ослов и мулов могут дать неубедительные результаты, что требует применения дополнительных диагностических методов.

Внутрикожно-пальпебральная проба – это самый чувствительный, надежный и специфичный маллеиновый тест для выявления инфицированных непарнокопытных, благодаря чему он в значительной степени вытеснил другие методы. 0,1 мл концентрированного ОБД маллеина вводят внутрикожно в нижнее веко, считывая результаты теста через 24 и 48 часов. Положительная реакция характеризуется заметным отеком века, с возможными гнойными выделениями из внутреннего угла глазной щели или конъюнктивы. Это обычно сопровождается повышением температуры. При отрицательном результате пробы обычно не наблюдают никакой реакции или развивается лишь небольшой отек нижнего века.

С. ПОТРЕБНОСТЬ В ВАКЦИНАХ И ДИАГНОСТИЧЕСКИХ БИОПРЕПАРАТАХ

Вакцин не существует.

ОБД маллеина имеется в продаже³. Приведенная ниже информация в общих чертах описывает потребности в производстве ОБД маллеина.

1. Управление посевным материалом

В производстве ОБД маллеина используются три штамма *Burkholderia mallei*, а именно, штамм Bogog (происходящий из Индонезии), штамм Mukteswar (Индия) и штамм Zagreb (Югославия). Посевной материал сохраняют как производственный запас сублимированных культур. Штаммы пересевают на глицериновом агаре при 37°C в течение 1-2 дней. Для поддержания вирулентности и антигенных характеристик штаммы можно перевивать на морских свинках.

2. Производство

Для производства ОБД маллеина используют питательную среду Дорсета-Хенли, обогащенную добавлением микроэлементов. Жидкую среду засевают густой суспензией в физиологическом растворе *B. mallei*, выращенных на глицериновом агаре. Производственную среду инкубируют при 37°C примерно в течение 10 недель. Затем бактерии убивают, обрабатывая их паром в течение 3 часов в стерилизаторе Коха. После этого жидкость пропускают через слой хлопковой ваты, чтобы удалить грубые скопления бактерий. Полученную мутную жидкость очищают мембранной фильтрацией и немедленно добавляют к девяти частям фильтра культуры одну часть 40% трихлоруксусной кислоты. Смеси позволяют отстояться в течение ночи для того, чтобы за это время из светлой коричневатой жидкости выпал сероватый осадок.

Надосадочную жидкость сливают и удаляют в отходы. Осадок центрифугируют в течение 15 минут с ускорением 2500 g, и слой осадка три раза или более отмывают в растворе 5% NaCl, pH 3, пока уровень pH не дойдет до 2,7. Отмытый осадок разжижают, размешивая его в минимальном количестве щелочного растворителя. Жидкость темно-коричневого цвета имеет pH 6,7. Этот концентрат маллеина снова центрифугируют, а надосадочную жидкость разбавляют равным количеством буферного раствора глюкозы. Содержание белка в этом продукте оценивают методом Кьельдаля и высушивают сублимацией после того, как продукт был распределен по ампулам.

3. Контроль в производственном процессе

В период инкубации флаконы регулярно осматривают на любые признаки загрязнения, а подозрительные флаконы выбраковывают. Типичный рост культуры *B. mallei* порождает мутность, выпадение осадка, некоторый рост на поверхности с тенденцией к опусканию и формирование заметного слегка окрашенного в оранжевый цвет кольца по краям поверхности питательной среды.

4. Контроль партий

Каждую партию ОБД маллеина проверяют на стерильность, безопасность, консерванты, содержание белка и активность.

Тестирование на стерильность выполняют в соответствии с рекомендациями европейской фармакопеи.

³ Центральный институт ветеринарного контроля и научных исследований, 06020 Этлик, Анкара, Турция; Институт Пастера, Бухарест, Румыния, Калея Джулести 333, Код: 060269, Сектор 6 aprovizionare@pasteur.ro

Исследование на безопасность проводят на пяти-десяти нормальных здоровых лошадях при помощи внутрикожно-пальпебрального теста. Развивающийся отек должен быть не более чем едва видимым и кратковременным без малейших признаков выделений из конъюнктивы.

Препараты, содержащие фенол в качестве консерванта, должны содержать не более 0,5% фенола в отношении веса к объему. Содержание белка должно составлять не менее 0,95 мг/мл и не более 1,05 мг/мл.

Тестирование активности проводят на морских свинках и лошадях. Животных сенсибилизируют подкожной прививкой концентрированной суспензии термически убитых бактерий *B. mallei* в жидком парафиновом адьюванте. Вместо лошадей также можно использовать рогатый скот. Производственную партию подвергают биологической оценке по сравнению со стандартным ОБД маллеина посредством внутрикожной инъекции в дозе 0,1 мл таким способом, который обеспечивает полную рандомизацию.

У морских свинок через 24 часа измеряют различные области эритемы, а у лошадей измеряют с помощью кутиметра увеличение толщины кожи. Результаты оценивают статистически, используя стандартные статистические методы для параллельной группы анализов.

ЛИТЕРАТУРА

Chantratita N., Vesaratchavest M., Wuthiekanun V., Tiyawisutsri R., Ulziitogtokh T., Akcay E., Day N.P. & Peacock S.J. (2006). Pulsed-field gel electrophoresis as a discriminatory typing technique for the biothreat agent *Burkholderia mallei*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 74, 345-347.

Elschner M.C., Scholz H.C., Melzer F., Saqib M., Marten P., Rassbach a., Dietzsch M., Schmoock G., de Assis Santana V.L., de Souza M.M., Wernery R., Wernery U. & Neubauer H. (2011). Use of a Western blot technique for the serodiagnosis of glanders. *BMC Vet. Res.*, 7, 4.

Glass M.B., Beesley C.A., Wilkins P.P. & Hoffmaster A.R. (2009). Comparison of four selective media for the isolation of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 80 (6), 1023-1028.

Glass M.B. & Popovic T. (2005). Preliminary evaluation of the API 20NE and RapID NF plus systems for rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei*. *J. Clin. Microbiol.*, 43, 479-483.

Godoy D., Randle G., Simpson A.J., Aanensen D.M., Pitt T.L., Kinoshita R. & Spratt B.G. (2003). Multilocus sequence typing and evolutionary relationships among the causative agents of melioidosis and glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *J. Clin. Microbiol.*, 41, 2068-2079.

Harvey S.P. & Minter J.M. (2005). Ribotyping of *Burkholderia mallei* isolates. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 44, 91 -97.

Katz J.B., Chieves., Hennager S.G., Nicholson J.M., Fisher T.A. & Byers P.E. (1999). Serodiagnosis of equine piroplasmiasis, dourine and glanders using an arrayed immunoblotting method. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 11, 292-294.

- Katz J., Dewald R. & Nicholson J. (2000). Procedurally similar competitive immunoassay systems for the serodiagnosis of *Babesia equi*, *Babesia caballi*, *Trypanosoma equiperdum*, and *Burkholderia mallei* infection in horses. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 12, 46-50.
- Khan I., Wieler L.H., Melzer F., Gwida M., Santana V.L., de Souza M.M., Saqib M., Elschner M.C. & Neubauer H. (2011). Comparative evaluation of three commercially available complement fixation test antigens for the diagnosis of glanders. *Vet. Rec.*, 169 (19), 495.
- [Khan I.](#), [Wieler L.H.](#), [Melzer F.](#), [Elschner M.C.](#), [Muhammad G.](#), [Ali S.](#), [Sprague L.D.](#), [Neubauer H.](#) & [Saqib M.](#) (2012). Glanders in animals: a review on epidemiology, clinical presentation, diagnosis and countermeasures. *Transbound. Emerg. Dis.*, doi: 10.1111/j.1865-1682.2012.01342.x
- Kumar S., Malik P., Verma S.K., Pal V., Gautam V., Mukhopadhyay C. & Rai G.P. (2011). Use of a recombinant *Burkholderia* intracellular motility a protein for immunodiagnosis of glanders. *Clin. Vaccine Immunol.*, 18 (9), 1456-1461.
- Lee M.A., Wang D. & Yap E.H. (2005). Detection and differentiation of *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei* and *Burkholderia thailandensis* by multiplex PCR. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 43, 413-417.
- Naureen A., Saqib M., Muhammad G., Hussain M.H. & Asi M.N. (2007). Comparative evaluation of Rose Bengal plate agglutination test, mallein test, and some conventional serological tests for diagnosis of equine glanders. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 19 (4), 362-367.
- Neubauer H., Finke E.-J. & Meyer H. (1997). Human glanders. *International Review of the Armed Forces Medical Services*, LXX, 10/11/12, 258-265.
- Neubauer H., Sprague L.D., Zacharia R., Tomaso H., Al Dahouk S., Wernery R., Wernery U. & Scholz H.C. (2005). Serodiagnosis of *Burkholderia mallei* infections in horses: state-of-the-art and perspectives. *J. Vet. Med. [B] Infect. Dis. Vet. Public Health.*, 52, 201-205.
- Scholz H.C., Joseph M., Tomaso H., Al Dahouk S., Witte A., Kinne J., Hagen R.M., Wernery R., Wernery U. & Neubauer H. (2006). Detection of the reemerging agent *Burkholderia mallei* in a recent outbreak of glanders in the United Arab Emirates by a newly developed fliP-based polymerase chain reaction assay. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 54, 241-247.
- Sprague L.D. & Neubauer H. (2004). A review on animal melioidosis with special respect to epizootiology, clinical presentation and diagnostics. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*, 51, 305-320.
- Sprague L.D., Zachariah R., Neubauer H., Wernery R., Joseph M., Scholz H.C. & Wernery U. (2009) Prevalence-dependent use of serological tests for diagnosing glanders in horses. *BMC Vet. Res.*, 5, 32.
- Sprague L.D., Zysk G., Hagen R.M., Meyer H., Ellis J., Anuntagool N., Gauthier Y. & Neubauer H. (2002). A possible pitfall in the identification of *Burkholderia mallei* using molecular identification systems based on the sequence of the flagellin fliC gene. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 34, 231-236.
- St. Georgiev V. (2008). Glanders. In: National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH: Impact on Global Health. Humana Press (Part of Springer Science+Business Media), New York, USA, 239-241.

Tanpiboonsak S., Paemanee A., Bunyarataphan S. & Tungpradabkul S. (2004). PCR-RFLP based differentiation of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. *Mol. Cell. Probes.*, 18, 97-101.

Thibault F.M., Valade E. & Vidal D.R. (2004). Identification and discrimination of *Burkholderia pseudomallei*, *B. mallei*, and *B. thailandensis* by real-time PCR targeting type III secretion system genes. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 5871 -5874.

Tomaso H., Scholz H.C., Al Dahouk S., Eickhoff M., Treu T.M., Wernery R., Wernery U. & Neubauer H. (2006). Development of a 5'-nuclease real-time PCR assay targeting flpI for the rapid identification of *Burkholderia mallei* in clinical samples. *Clin. Chem.*, 52, 307-310.

Ulrich M.P., Norwood D.A., Christensen D.R. & Ulrich R.L. (2006). Using real-time PCR to specifically detect *Burkholderia mallei*. *J. Med. Microbiol.*, 55, 551-559.

U'Ren J.M. Van Ert M.N., Schupp J.M., Easterday W.R., Simonson T.S., Okinaka R.T., Pearson T. & Keim P. (2005). Use of a real-time PCR TaqMan assay for rapid identification and differentiation of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *J. Clin. Microbiol.*, 43, 5771-5774.

Wernery U. (2009). Glanders. *In: Infectious Diseases of the Horse*, Mair T.S. & Hutchinson R.E., eds. Equine Veterinary Journal Ltd, Cambridgeshire, UK, 253-260.

Wittig M.B., Wohlsein P., Hagen R.M., Al Dahouk S., Tomaso H., Scholz H.C., Nikolaou K., Wernery R., Wernery U., Kinne J., Elschner M. & Neubauer H. (2006). Glanders - a comprehensive review. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, 113, 323-230.

Xie X., Xu F., Xu B., Duan X. & Gong R. (1980). A New Selective Medium for Isolation of Glanders Bacilli. Collected papers of veterinary research. Control Institute of Veterinary Biologics, Ministry of Agriculture, Peking, China (People's Rep. of), 6, 83-90.

Yabuuchi E., Kosako Y., Oyaizu H., Yano I., Hotta H., Hashimoto Y., Ezaki T. & Arakawa M. (1992). Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol. Immunol.*, 36, 1251-1275.

*

* *

ВНИМАНИЕ: Существуют Справочные лаборатории МЭБ по диагностике сапа (См. таблицу, приведенную в части 4 настоящего *Руководства по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных* или посетите веб-сайт МЭБ для получения актуального списка лабораторий: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Для получения более подробной информации, касающейся тестов и реагентов для диагностики сапа, просим Вас обращаться в Справочные лаборатории МЭБ.