

УДК: 579.62:636.22/.28

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2024.4.35

КОНТРОЛЬ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ И СТАБИЛЬНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РЕФЕРЕНТНОГО ШТАММА *BRUCELLA CANIS* RM 6/66 ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ХРАНЕНИИ

Панкова Е.В. – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. (ORCID 0000-0003-4446-4619); Артемьева Е.А. – канд. ветеринар. наук, ст. науч. сотр., нач. отдела - Государственная коллекция микроорганизмов (ORCID 0000-0002-6204-6077); Мельникова Л.А. – канд. ветеринар. наук, вед. науч. сотр. (ORCID 0000-0002-0159-3843); Мустафина Э.Н. – канд. ветеринар. наук, вед. науч. сотр. (ORCID 0000-0002-1997-5575); Громова Е.А. – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. (ORCID 0000-0002-0416-6193)

ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной
и биологической безопасности»

*katerinka_ja@bk.ru

Ключевые слова: штаммы, патогены, сохранное депонирование, коллекции микроорганизмов, биопрепараты.

Key words: strains, pathogens, safe deposit, collection of microorganisms, bio drugs.

Финансирование: Материалы подготовлены за счет средств ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» в рамках научно-исследовательской работы по теме «Изучение биологических характеристик штаммов возбудителей особо опасных болезней животных и их стабильности в процессе длительного хранения».

Поступила: 18.09.2024

Принята к публикации: 02.12.2024

Опубликована онлайн: 16.12.2024



РЕФЕРАТ

Бруцеллез собак, вызываемый бруцеллой вида *canis*, все больше приобретает важное эпизоотологическое и эпидемиологическое значение во всем мире и наносит большой экономический ущерб собаководству. Сохранение патогенов в жизнеспособном состоянии с их первоначальными свойствами в течение длительного времени имеет первостепенное значение при разработке и производстве биопрепаратов профилактического, диагностического и лечебного назначения. Данную функцию выполняют Государственные коллекции микроорганизмов. Целью данной работы было изучить референтный штамм *Brucella canis* RM 6/66, хранившийся более 20 лет в лиофилизированном виде, определив его жизнеспособность и изучив биологические свойства, и таксономическую принадлежность. Полученные нами результаты показали, что исследуемый штамм при посеве на питательные среды, соответствующие данному виду возбудителя. Исследование его биологических свойств, с помощью тестов для определения диссоциации, показало, что штамм диссоциирован, в виду чего проведен отбор и отсев колоний, окрашенных по Уайт-Вилсону. Получена чистая культура штамма *Brucella*

canis RM 6/66 в R-форме (колонии темно-фиолетовые, с ровными краями и неровной поверхностью). Использование ПЦР-РВ метода идентификации с применением видоспецифичных праймеров и TagMan-зонда, показало, что штамм *B. canis* RM 6/66 по всем десяти локусам соответствует представленному в международных базах, данных референтному штамму.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Бруцеллез собак, вызываемый бруцеллой вида *canis*, все больше приобретает важное эпизоотологическое и эпидемиологическое значение во всем мире и наносит большой экономический ущерб собаководству. Данное заболевание широко распространено на всех континентах земного шара, за исключением Новой Зеландии и Австралии [1].

Случаи заболевания бруцеллезом собак в нашей стране выявлены начиная с 50-х гг. прошлого столетия, первые сообщения приводят П.А. Вершилова (1972), И.А. Измайлов (1950), Р.З. Исламов с соавт. (1970) и др. [2, 3, 4].

В РФ, в 1994 году впервые была выделена и идентифицирована культура *Brucella canis* из абортрованного плода стаффордширского терьера. Затем в 1998 был зарегистрирован случай заболевания в Москве, а в 1999 году выделена культура этого заболевания в Санкт-Петербурге [3].

Бруцеллез собак считается зооантропонозным заболеванием и является социально значимой инфекцией, передающейся от больных животных к человеку [3,6].

Для контроля эпизоотического благополучия РФ по данному заболеванию, необходимы надежные диагностические и профилактические ветеринарные препараты [7]. На данный момент для диагностики бруцеллеза собак в реакции агглютинации (РА) и реакции связывания комплемента (РСК) разработаны антигены из референтного штамма RM 6/66, также проводятся исследования, посвященные созданию антигена для диагностики бруцеллеза собак в реакции иммунодиффузии (РИД) [8].

В Государственной коллекции штаммов - возбудителей особо опасных болезней, используемых в ветеринарии и животноводстве хранятся и поддерживаются

более 300 штаммов возбудителя бруцеллеза 6 видов, куда в том числе, входит и *Brucella canis* [9].

Основной задачей Коллекции патогенов является поддержание штаммов в жизнеспособном состоянии с сохранением их первоначальных биологических свойств в течение максимально возможного времени. Известно, что при правильном отборе и поддержании штамма культуры должны сохранять однородность по морфологическим и культуральным свойствам и не проявлять признаков диссоциации клеток и колоний [10]. От сохранности штаммов в неизменном виде зависит разработка и изготовление различных ветеринарных профилактических, лечебных и диагностических препаратов [11]. Для решения вышеперечисленных задач в Государственной коллекции патогенов применяется один из широко используемых методов длительной консервации штаммов – лиофилизация. Считается, что лиофилизированные штаммы могут длительное время сохраняться в жизнеспособном состоянии, не теряя своих изначальных свойств. Это отмечают другие авторы в своих работах, указывая, что лиофилизированные штаммы микроорганизмов сохраняют свои культурально-морфологические, физиологические, биохимические свойства [12, 13]. Однако необходимо отметить, что при процедуре лиофилизации и дальнейшего хранения штамма, его выживаемость зависит от таких факторов, как особенность вида и штамма, стадия роста патогена, концентрация клеток, условия культивирования, выбор режима лиофилизации, условия хранения и другие.

Принимая во внимание вышесказанное, целью работы было изучить референтный штамм *Brucella canis* RM 6/66, хранившийся более 20 лет в лиофилизированном виде, определив его жизнеспособность.

способность и изучив биологические свойства, и таксономическую принадлежность.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Работа с референтным штаммом *Brucella canis* RM6/66 и ведение записей в формах учета проводилась в соответствии с СанПиН 3.3686-21 и ГОСТ 33675-2015 [5, 14]. Для определения жизнеспособности и сохранности биологических свойств проводили посев культуры на печеночно-пептонный глюкозо-глицериновый агар (ПППГА) и печеночно-пептонный глюкозо-глицериновый бульон (ППГТБ). С выросших культур делали посевы, получали 2 генерацию, ее проверяли на характерность роста на данных питательных средах. Диссоциацию изучали в реакции термоагглютинации, пробой на предметном стекле с раствором акрифлавина и окраской колоний по Уайт-Уилсона [14]. Агглютиногенность и агглютинабельность проверяли в реакции агглютинации на предметном стекле с S-, и R- бруцеллезными агглютинирующими сыворотками. Учет результатов проводили в течение 1-3 мин и оценивали в крестах. Тинкториально-морфологические свойства изучали методом микроскопии мазков, приготовленных из 2-х суточной агаровой культуры на предметном стекле, фиксированную смесь Никифорова и окрашенную по Граму и Козловскому. Подвижность определяли методом висячей капли под микроскопом. Редуцирующую активность в отношении красок проводили в чашках Петри. Образование сероводорода изучали путем приготовления двухсуточной взвеси культуры в физиологическом растворе. Результаты учитывали в течение 6 суток, с интервалом в 2 дня.

Для выделения ДНК использовали набор «ДНК-сорб-В» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии, Россия) согласно инструкции производителя. ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) проводили на ДНК-амплификаторе C1000 с оптическим блоком CFX96 («Bio-Rad», Сингапур) с использованием видоспецифичных прайме-

ров, реакционной смеси и программы амплификации, разработанных нами в предыдущих исследованиях [15, 16].

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

В соответствии с поставленной целью, проведена работа по определению жизнеспособности референтного штамма *Brucella canis* RM 6/66 и изучены его биологические свойства. Результаты, полученные при этом, показали, что штамм жизнеспособен, дает рост на 4-6 сут на ППГА в виде мелких, выпуклых, негладких колоний, белого цвета. На ППГТБ наблюдалось - равномерное помутнение и пристеночное кольцо.

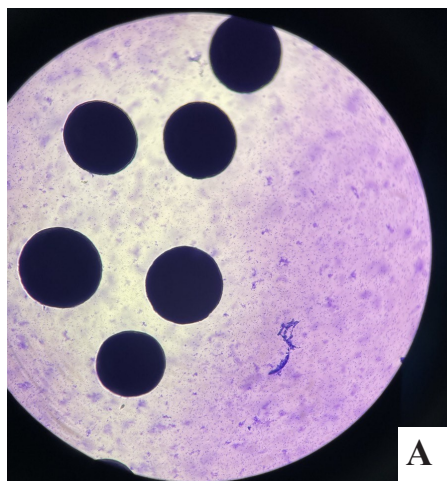
Исследования его на диссоциацию показали следующее - в поставленной реакции термоагглютинации взвесь остается гомогенной, на дне пробирки незначительный осадок; в пробе с раствором акрифлавина на предметном стекле - агглютинация с образованием хлопьев и незначительной гомогенностью; при окраске колоний по Уайт-Вилсону наблюдали в поле зрения колонии светло - желтого цвета, темно-фиолетовые и радиально исчерченные (Рис. 1 а, б). Данная картина дает возможность судить об изменении состава популяции изучаемого штамма. Это подтверждают и данные РА на стекле с R- сывороткой, штамм дал положительную реакцию на три креста («+++») – образование агглютината и не полное просветление жидкости, с S- сывороткой отрицательную реакцию («+»), без просветления жидкости, смесь осталась гомогенная. В контроле с физиологическим раствором самоагглютинация отсутствовала.

Анализ результатов, полученных при постановке вышеуказанных тестов показал, что штамм диссоциирован. Ранее в работах других авторов описывалось явление изменчивости бруцелл с образованием R- и S-формы [3, 17]. Прделанная нами работа по отбору и отсеvu колоний, не имеющих каких-либо дефектов, отличающих их от колоний характерных для R-форм (темно-фиолетовые, с ровными краями неровной поверхностью) на скошенный агар в пробирки, а затем на чаш-

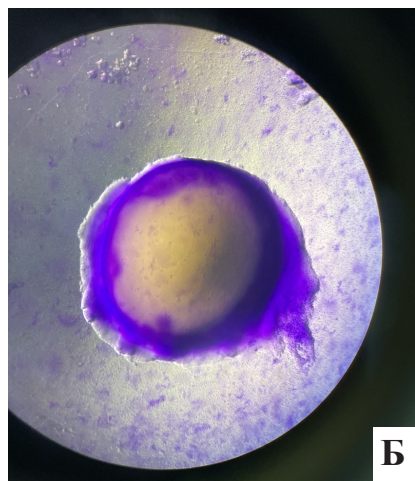
ки Петри, позволила получить чистую культуру референтного штамма *Brucella canis* RM 6/66 в R-форме (Рис.1 а).

При исследовании ее на соответствие характеристик, предусмотренных в паспорте на штамм, получены следующие данные: культура дает рост на ППГА в виде мелких, выпуклых, негладких колоний, белого цвета; на ППГБ равномерное помутнение и пристеночное кольцо; в окрашенных мазках мелкие, похожие на кокки бактерии, расположенные отдельно, попарно и кучно, окрашены в розовый цвет (по Граму) и в красный цвет (по Козловскому); в поставленной реакции термоагглютинации на дне пробирки клетки бруцелл, надосадочная жидкость просветленная; в пробе с раствором акрифлавина на предметном стекле – хорошо выраженные хлопья, жидкость просветленная; при окраске колоний по Уайт-Вилсону в поле зрения колонии темно-фиолетового цве-

та; РА на стекле с R- сывороткой, штамм дает положительную реакцию на четыре креста («++++») – образование агглютината и полное просветление жидкости, с S-сывороткой отрицательную реакцию («-») при этом жидкость однородная, осадок отсутствует. В контроле с физиологическим раствором самоагглютинация отсутствует; культура штамма в препарате ви- сячей капли, просмотренная под микроскопом – неподвижная; штамм активен в отношении тионина, в разведении 1:25 тыс. слабый сплошной рост в первых двух штрихах, в разведении 1:50 тыс. и 1:100 тыс. выраженный рост культуры во всех штрихах, в отношении фуксина не активен, в разведении 1:50 тыс. и 1:100 тыс. рост культуры отсутствует; образует сероводород, так как свободный край индикаторной бумажки пропитанной ацетатом свинца приобретает черную окраску.



А



Б

Рисунок 1 – Морфологические особенности R- и S- форм колоний *Brucella canis* RM 6/66, окрашенных по методу Уайт-Вилсона. Микрофотосъемка в падающем свете. x 13.
А – полное прокрашивание; Б – частичное.

Для подтверждения таксономической принадлежности исследуемого штамма был использован ПЦР-РВ метод идентификации с применением видоспецифичных праймеров и TagMan-зонда, разработанный нами ранее на основе специфических для представителей вида *B. canis* ДНК-маркеров [15, 16]. Учет флуорес-

центного сигнала проводили по каналу Cy5. ПЦР-РВ с использованием ДНК штамма *B. canis* RM 6/66 показала рост сигнала флуоресценции по каналу Cy5, что соответствует положительному результату проведенной ПЦР-амплификации. Следует отметить, что штамм *B. canis* RM 6/66 является рефе-

рентным, а его геном полностью секвенирован и аннотирован в базе данных GenBank: CP007758.1 (I хромосома), CP007759.1 (II хромосома). В предыдущем исследовании по результатам MLVA-10 анализа было установлено, что используемый в рамках данного исследования референтный штамм *B. canis* RM 6/66 по всем десяти локусам соответствует представленному в международных базах, данных ранее изученному референтному штамму [18]. Также на основании кластерного анализа десяти VNTR-локусов было показано, что штамм *B. canis* RM 6/66 расположен на дендрограмме в соответствии с его таксономическим положением [18].

ВЫВОДЫ /CONCLUSION

Данные исследования показали, что референтный штамм *Brucella canis* RM 6/66 хранившийся в течение 20 лет в лиофилизированном виде при температуре плюс 4°C – жизнеспособен, но при исследовании тестами, предусмотренными для определения диссоциации, установили, что он диссоциирован. В результате отбора и отсева колоний, не имеющих каких-либо дефектов, отличающих их от колоний характерных для R-форм (темно-фиолетовые, с ровными краями неровной поверхностью) на скошенный агар в пробирки, а затем на чашки Петри получили чистую культуру референтного штамма *Brucella canis* RM 6/66 в R-форме. Молекулярно-генетические исследования данного штамма, показали, что он по всем десяти локусам соответствует представленному в международных базах, данных референсному штамму. Полученная культура штамма *Brucella canis* RM 6/66 будет использована для дальнейших сравнительных исследований выживаемости культур возбудителей особо опасных болезней в процессе длительного хранения, с учётом сроков хранения бактерии, условий и защитных сред.

CONTROL OF VIABILITY AND STABILITY OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF THE REFERENCE BRUCELLA CANIS RM6/66 STRAIN DURING LONG-TERM STORAGE

Pankova E.V. – Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher (ORCID 0000-0003-4446-4619), **Artemeva E.A.** – Candidate of Veterinary Sciences., Senior Researcher, Head of Department – State Collection of Microorganisms (ORCID 0000-0002-6204-6077), **Melnikova L.A.** - Candidate of Veterinary Sciences., Leading Researcher (ORCID 0000-0002-0159-3843), **Mustafina E.N.** - Candidate of Veterinary Sciences., Leading Researcher (ORCID 0000-0002-1997-5575), **Gromova E.A.** - Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher (ORCID 0000-0002-0416-6193).

Federal State Budgetary Scientific Institution «Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological safety»

*katerinka_ja@bk.ru

Financing: *The materials were prepared using the funds of the Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety within the research “Study of the biological characteristics of strains of infectious and especially dangerous animal diseases and their stability during long-term storage”.*

ABSTRACT

Brucellosis is a particularly dangerous infectious disease that causes enormous economic damage to livestock farms specializing in the breeding of cattle, sheep and pigs. Preservation of pathogens in a viable state with their original properties over a long period is one of the main tasks of the State collections of microorganisms. The aim of this paper was to study the reference strain *Brucella canis* RM 6/66, stored for more than 20 years in lyophilized form, determining its viability and investigating its biological properties and taxonomic affiliation. The obtained results are showed that the studied strain, when seeded on nutrient media corresponding to this species of pathogen, is viable. The study of its biological properties, using tests to determine dissociation, showed that the strain was dissociated, due to which a selection and cultivation of colonies ac-

cording to White-Wilson. The pure culture of the strain of *Brucella canis* RM 6/66 in the R-form was obtained, (colonies are dark purple, with smooth edges and an uneven surface). The use of the RT-PCR identification method using species-specific primers and a TagMan probe showed that the strain *B. canis* RM 6/66 corresponds to the reference strain presented in international databases at all ten loci.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Carmichael L. E., Kenney R. M. Canine abortion caused by *Brucella canis* // Journal of the American Veterinary Medical Association. 1968. № 6 (152). P. 605-616.
2. Вершилова П.А. Бруцеллез. М.: Медицина, 1972. 439 с.
3. Косилов И.А. Изменчивость бруцелл и ее значение в проблеме бруцеллеза сельскохозяйственных животных: автореф. на соиск. ученой степ. д-ра вет. наук: 16.00.03 - ветеринарная эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология. Фрунзе, 1975. 39 с.
4. Генджиева О.Б., Руденко А.В. Эпизоотология и эпидемиология бруцеллеза в республике Калмыкии // Вестник Калмыцкого университета. 2013. № 1(17). С.10-15. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-23-27.
5. СанПиН 3.3686-21. Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней: санитарно-эпидемиологические правила и нормативы: издание официальное: утверждены постановлением Главного государственного санитарного врача РФ А. Ю. Поповой 28 января 2021 г. № 4: введены впервые: дата введения 2021-01-09 // Официальный электронный фонд правовых и нормативно-технических документов. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/573660140> (дата обращения: 24.08.2024).
6. Cordon J.C., Pue H.L., Rutgers H.C. Canine brucellosis in Nouchold // J.A.V.M.A. 1985. № 7(186). P. 695-698. DOI: 10.3389/fvets.2021.594291.
7. Р. Юсупова. Обеспечение благополучия свиноводческих хозяйств от особо опасных инфекций // Доклад заместителя директора ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (Казань) на Международном ветеринарном конгрессе в Казани. URL: https://soyanews.info/news/obespechenie_blagopoluchiya_svinovodcheskikh_khozyaystv_ot_osobo_opasnykh_infekts.html (дата обращения: 24.08.2024).
8. Зинова А.А. Разработка РИД-тест-системы для диагностики бруцеллеза собак, вызываемого *B. canis*: автореф. на соиск. ученой степ. канд. биол. наук: 16.00.03 - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология. М., 2009. 22 с.
9. Артемьева Е. А., Мельникова Л. А., Родионов А. П. К 45-летию деятельности Государственной коллекции штаммов – возбудителей особо опасных болезней, используемых в ветеринарии и животноводстве // Инновационные решения актуальных вопросов биобезопасности: материалы Международной научно-практической конференции. Казань. 2022. С. 145-148.
10. Общие фармакопейные статьи на препараты пробиотиков для государственной фармакопеи РФ XIII издания - первый опыт в мировой фармакопейной практике / И.Г. Осипова [и др.] // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2016. № 6(2): С. 272–277.
11. Осидзе Д.Ф. Ветеринарные препараты. М.: Колос, 1981. 448 с.
12. Гришкина Т.А., Тимофеева Е.В., Спиридонов В.А. Оценка результатов хранения музейных штаммов возбудителя сапа в течение длительного периода // Проблемы особо опасных инфекций. 2004. № 87. С. 40-42.
13. Цуцаева А.А., Ананьина А.Е. Изучение влияния некоторых параметров процесса лиофилизации на жизнеспособность споровой культуры *Strepfomyces fradiae* ВНИИГ – 25А // Проблемы криобиологии. 2002. № 2. С. 26–915. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-66-70.
14. ГОСТ 33675-2015. Животные. Лабора-

торная диагностика бруцеллеза. Бактериологические методы: межгосударственный стандарт Российской Федерации: издание официальное: утвержден и введен в действие приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 24 ноября 2015 г. № 1949-ст: введен впервые: дата введения 2017-01-01 / разработан Федеральным государственным бюджетным учреждением «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»). М.: Стандартинформ, 2016. 20 с.

15. Подбор оптимальных условий постановки ПЦР для идентификации возбудителя бруцеллеза собак / Е. А. Анисимова [и др.] // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2023. № 12(230). С. 55-59. DOI: 10.53083/1996-4277-2023-230-12-55-59.

16. Разработка мультиплексной ПЦР-РВ тест-системы для выявления возбудителя бруцеллеза / Е. А. Громова [и др.] // Ветеринарный врач. 2024. № 3. С. 34 – 4018. DOI: 10.33632/1998-698X_2024_3_34.

17. Изучение морфологических свойств изолятов бруцелл в S- и R-формах электронно-микроскопическим методом / А. Р. Сансызбай [и др.] // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2013. № 12 (110). С. 074-079.

18. Применение HRM-анализа кривых плавления, полученных после амплификации VNTR-локусов, для идентификации и дифференциации штаммов бруцелл / Е.А. Анисимова [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. 2023. № 4. С. 42-49. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-42-49.

REFERENCES

1. Carmichael L. E., Kenney R. M. Canine abortion caused by *Brucella canis* // Journal of the American Veterinary Medical Association. 1968. № 6 (152). P. 605-616.
2. Vershilova P.A. Brucellosis. Moscow: Medicine, 1972. 439 p. (In Russ.)
3. Kosilov I.A. *Brucella* variability and its importance in the problem of brucellosis of

farm animals: author's abstract for a dissertation for a doctor of veterinary sciences: 16.00.03 - veterinary epizootology, mycology with mycotoxicology and immunology. Frunze, 1975. 39 p. (In Russ.)

4. Gendzhieva O.B., Rudenko A.V. Epizootology and epidemiology of brucellosis in the Republic of Kalmykia // Bulletin of the Kalmyk University. 2013. № 1 (17). P.10-15. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-23-27. (In Russ.)

5. SanPiN 3.3686-21. Sanitary and epidemiological requirements for the prevention of infectious diseases: sanitary and epidemiological rules and regulations: official publication: approved by the resolution of the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation A. Yu. Popova on January 28, 2021, No. 4: introduced for the first time: date of introduction 2021-01-09 // Official electronic fund of legal and regulatory and technical documents. - URL: <https://docs.cntd.ru/document/573660140> (date of access: 08/24/2024). (In Russ.)

6. Cordon J.C., Pue H.L., Rutgers H.C. Canine brucellosis in Nouschold // J.A.V.M.A. 1985. № 7(186). P. 695-698. DOI: 10.3389/fvets.2021.594291.

7. R. Yusupova. Ensuring the welfare of pig farms from especially dangerous infections // Report of the Deputy Director of the Federal State Budgetary Institution "FCTRB-VNIVI" (Kazan) at the International Veterinary Congress in Kazan. URL: https://soyanews.info/news/obespechenie_blagopoluchiya_svinovodcheskikh_khoz_yaystv_ot_osobo_opasnykh_infekts.html (date of access: 08/24/2024). (In Russ.)

8. Zinova A.A. Development of a RID test system for the diagnosis of canine brucellosis caused by *B. canis*: author's abstract for a dissertation on the scientific degree of Cand. Sci. (Biol.): 16.00.03 - veterinary microbiology, virology, epizootology, mycology with mycotoxicology and immunology. Moscow, 2009. 22 p. (In Russ.)

9. Artemyeva E. A., Melnikova L. A., Rodionov A. P. On the 45th anniversary of the State Collection of Strains - Pathogens of Particularly Dangerous Diseases Used in

- Veterinary Medicine and Animal Husbandry // Innovative Solutions to Current Biosafety Issues: Proceedings of the International Scientific and Practical Conference. Kazan. 2022. P. 145-148. (In Russ.)
10. General Pharmacopoeia Articles on Probiotic Preparations for the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIII Edition - the First Experience in World Pharmacopoeial Practice / I. G. Osipova [et al.] // International Journal of Applied and Fundamental Research. 2016. № 6 (2): P. 272–277. (In Russ.)
11. Osidze D. F. Veterinary Preparations. Moscow: Kolos, 1981. 448 p. (In Russ.)
12. Grishkina T.A., Timofeeva E.V., Spiridonov V.A. Evaluation of the results of storage of museum strains of the glanders pathogen over a long period // Problems of especially dangerous infections. 2004. № 87. P. 40-42. (In Russ.)
13. Tsutsaeva A.A., Ananyina A.E. Study of the influence of some parameters of the lyophilization process on the viability of the spore culture of *Streptomyces fradiae* VNIIG - 25A // Problems of cryobiology. 2002. № 2. P. 26-915. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-66-70. (In Russ.)
14. GOST 33675-2015. Animals. Laboratory diagnostics of brucellosis. Bacteriological methods: interstate standard of the Russian Federation: official publication: approved and put into effect by order of the Federal Agency for Technical Regulation and Metrology dated November 24, 2015 No. 1949-st: introduced for the first time: date of introduction 2017-01-01 / developed by the Federal State Budgetary Institution "All-Russian State Center for Quality and Standardization of Animal Medicines and Feed" (FGBU "VGNKI"). Moscow: Standartinform, 2016. 20 p. (In Russ.)
15. Selection of optimal conditions for setting up PCR to identify the causative agent of canine brucellosis / E. A. Anisimov [et al.] // Bulletin of the Altai State Agrarian University. 2023. № 12 (230). P. 55-59. DOI: 10.53083/1996-4277-2023-230-12-55-59. (In Russ.)
16. Development of a multiplex PCR-RV test system for detecting the causative agent of brucellosis / E. A. Gromova [et al.] // Veterinary doctor. 2024. № 3. P. 34 – 4018. DOI: 10.33632/1998-698X_2024_3_34. (In Russ.)
17. Study of morphological properties of *Brucella* isolates in S- and R-forms by electron microscopy / A. R. Sansyzbay [et al.] // Bulletin of the Altai State Agrarian University. 2013. № 12 (110). P. 074-079. (In Russ.)
18. Application of HRM analysis of melting curves obtained after amplification of VNTR loci for identification and differentiation of *Brucella* strains / E. A. Anisimov [et al.] // Problems of especially dangerous infections. 2023. № 4. P. 42–49. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-42-49. (In Russ.)