

Возбудитель сибирской язвы.

Электронное пособие по ПЗ, СРСП и СРС
Составитель: д.м.н, профессор Рамазанова
Б.А.

КЛАССИФИКАЦИЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ:

Сем. BACILLACEAE

Род BACILLUS

Вид B. ANTHRACIS

1876 Г- Р.КОХ ВЫДЕЛИЛ МИКРОБ

(ANTHRAХ- КАРБУНКУЛ)

МОРФОЛОГИЯ:

- **ГРАМ (+) КРУПНАЯ ПАЛОЧКА** В ЦЕПОЧКУ ИЛИ ЕДИНИЧНО

- ВНЕ ОРГАНИЗМА - ОВАЛЬНЫЕ **СПОРЫ**, РАСПОЛОГАЮЩИЕСЯ **ЦЕНТРАЛЬНО**, РАЗМЕР НЕ ПРЕВЫШАЕТ ДИАМЕТРА МИКРОБНОЙ КЛЕТКИ

- **В ОРГАНИЗМЕ ХОЗЯИНА** ИЛИ НА СРЕДАХ С КРОВЬЮ ОБРАЗУЮТ **КАПСУЛУ**

КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА:

-АЭРОБ ИЛИ ФАКУЛЬТАТИВНЫЙ АНАЭРОБ

-РАСТЕТ НА ПРОСТЫХ СРЕДАХ (мпа, мпб)

- КОЛОНИИ –R –ФОРМЫ – **«ГОЛОВА МЕДУЗЫ»**, **«ЛЬВИНАЯ ГРИВА»**.

- НА ЖЕЛАТИНЕ – **РОСТ В ВИДЕ «ПЕРЕВЕРНУТОЙ ЕЛОЧКИ»**

Фактор,
обеспечивающий
высокую устойчивость
возбудителя во
внешней среде:

Способность
образовывать споры; в
воде споры
сохраняются до 10 лет,
в почве – до 30 лет и
более

Фактор,
обеспечивающий
защиту возбудителя от
иммунных механизмов
хозяина (от
поглощения бактерией
фагоцитами, вне- и
внутриклеточных
продуктов фагоцитоза)

–
капсула

Особенность химического состава капсулы *B. ANTHRACIS*-

Белок,

в то время как у большинства других бактерий -
полисахарид

Рис. Микроскопическая картина клеток *B. anthracis* в окрашенных мазках

культур, выращенных на агаре Хоттингера в течение 24 ч (а, б) и хранившихся при 0-4 ос 96 ч (в).

а - штамм Ч-7; б, в - штамм 14/41.

Окраска кристаллическим фиолетовым (а) и по Граму (б, в).
x1150.

Микробы расположены поодиночке, попарно или соединены в нити и цепочки.

Свободные полюса клеток закругленные, а внутри цепочек прямые.

Целые клетки грамположительные, окрашены в фиолетовый или черно-фиолетовый цвет.

Лизированные микробы грам отрицательные и выглядят

розовыми.

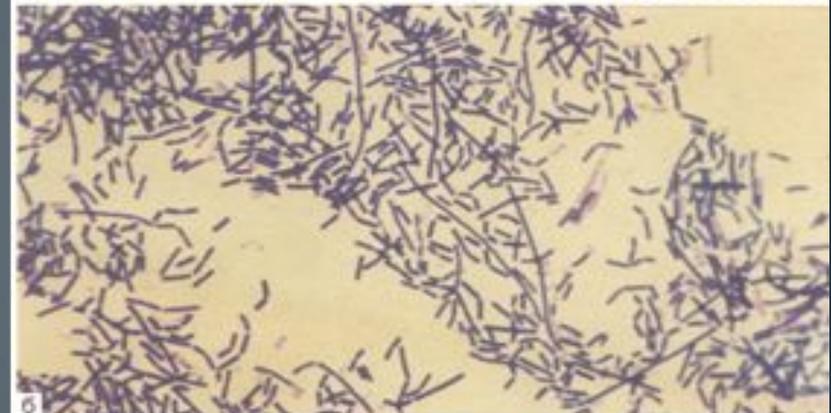
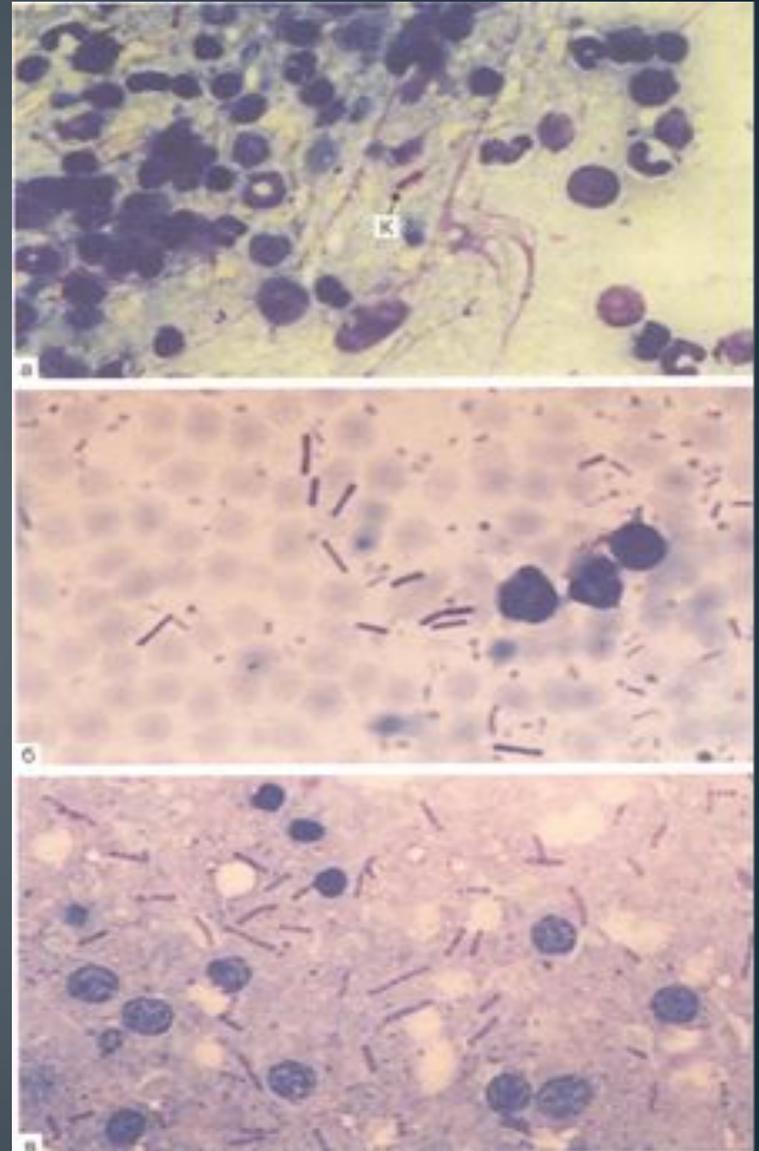


Рис. Клетки *B. anthracis* в мазках-отпечатках селезенки белой мыши, павшей от сибирской язвы.

Окраска по Романовскому-Гимзе. х 1150.

а - бациллы расположены поодиночке или попарно, могут иметь капсулу;

б, в - исчезновение капсулы при хранении трупного материала или разрушении в процессе приготовления препарата.



**Рис. Прижизненная
микроскопическая картина
клеток возбудителя сибирской
язвы, выращенных на агаре
Хоттингера в течение 24 ч.**

а - штамм Ч-7; б - штамм 14/41.
Иммобилизация клеток агаровым
гелем. Фазовый контраст. x 1350.

Споры светлые и овальные.
Бациллы темные, имеют форму
удлинённых цилиндров,
расположены поодиночке,
попарно или соединены в
цепочки. Полюса бацилл
закруглены. Внутри клеток
мелкие светлые гранулы
липидов и крупные, ярко
блестящие споры.
Лизирующиеся бациллы
отличаются пониженной
оптической плотностью

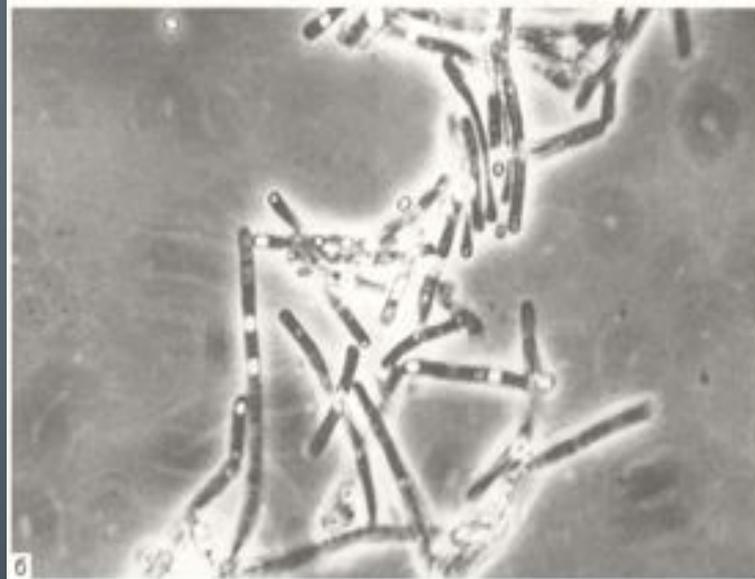
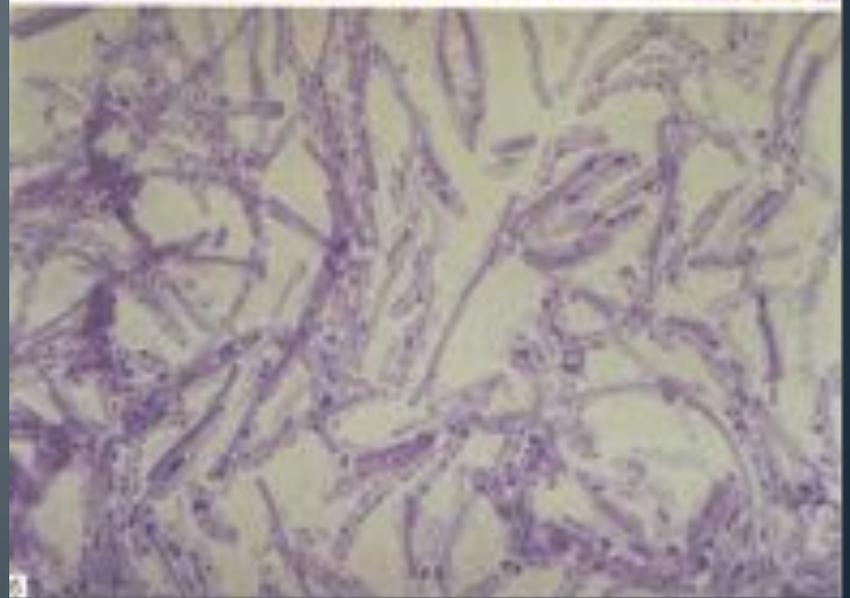


Рис. Капсула клеток *B. anthracis* в окрашенных мазках культур, выращенных на бикарбонатном агаре в атмосфере углекислого газа в течение 48 ч. Штамм 14/41. x1150.

а - окраска по Романовскому-Гимзе, капсула в виде розовой бахромы окружает фиолетовые клетки;

б - окраска по методу Гутштейна, прокрашивается наружная граница капсулы



**Рис. Капсула живых
сибиреязвенных
бацилл.**

а - штамм 14/41; **б** -
штамм Ч-7. Влажный
тушевой метод.
Фазовый контраст.
x1350.

**Капсула препятствует
проникновению
частиц туши к клеткам
и по этой причине
выглядит в виде
ореола, окружающего**

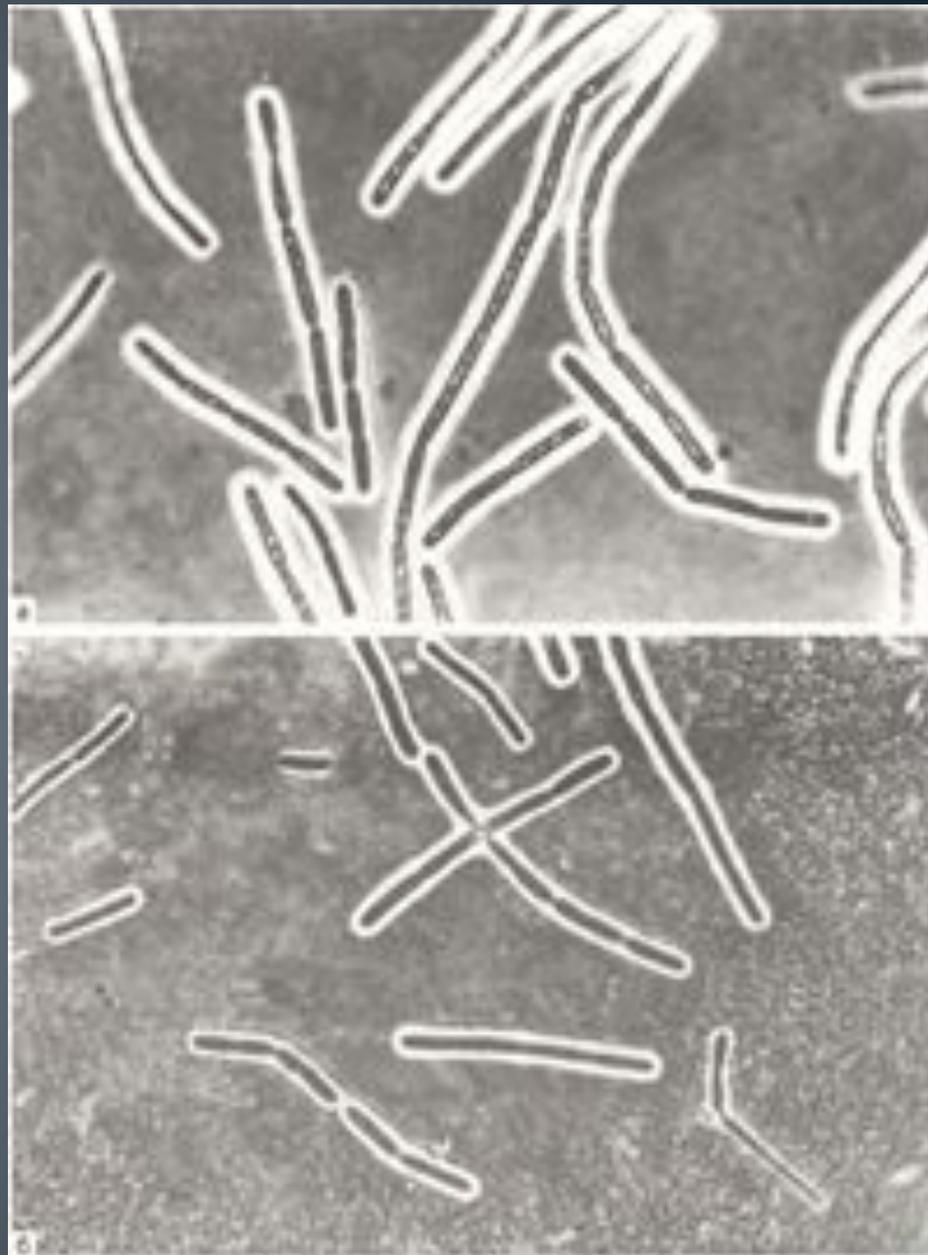
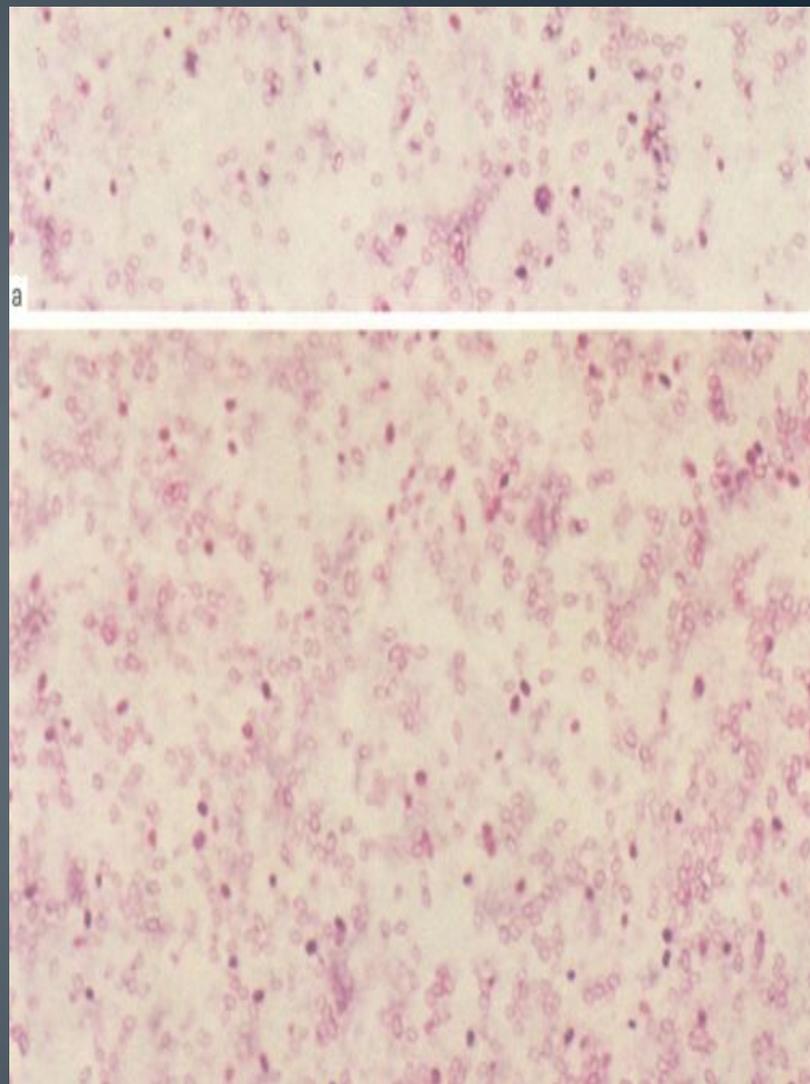


Рис. Микроскопическая картина спор *B. anthracis* в окрашенных мазках культур, выращенных на агаре Хоттингера в течение 72 ч.

а - штамм СТИ-1; **б** - штамм 71/12.

Окраска по методу Циля-Нильсена. x1150.

Спороплазма у неповрежденных спор не прокрашивается. Деструктивно измененные споры прокрашены полностью.



**Рис. Прижизненная
микроскопическая
картина спор *B. anthracis*.**

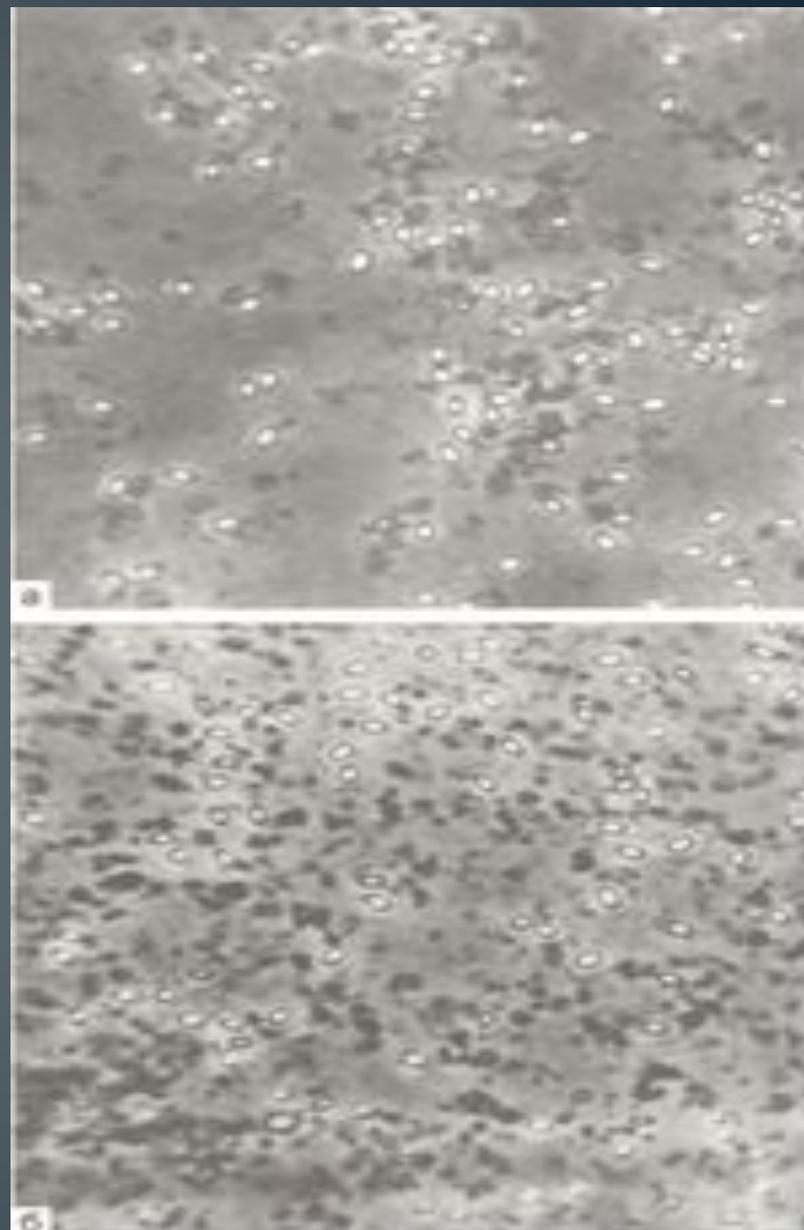
Иммобилизация спор
агаровым гелем. Фазовый
контраст.

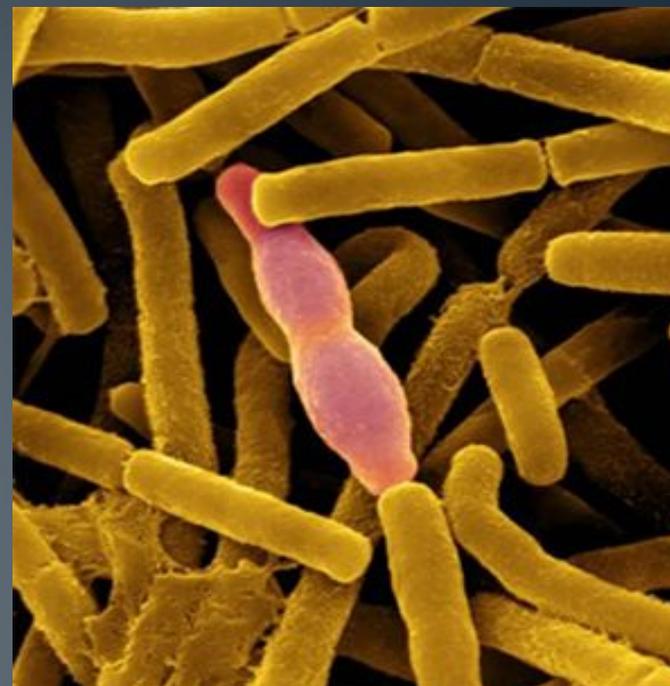
1350.

**Неповрежденные споры
блестящие, вальной
формы, с резко
очерченными контурами
(а).**

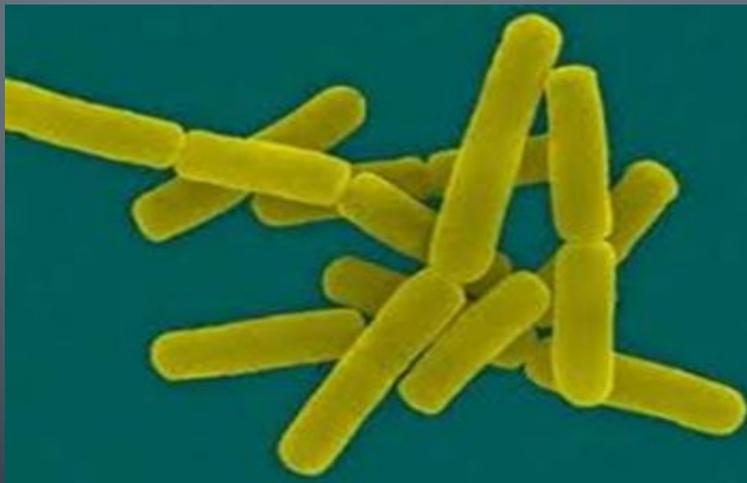
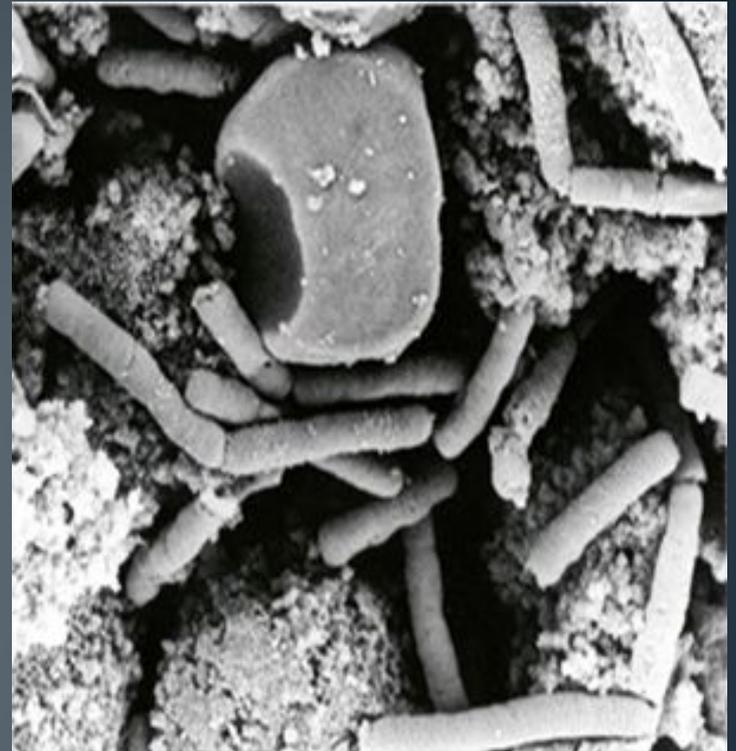
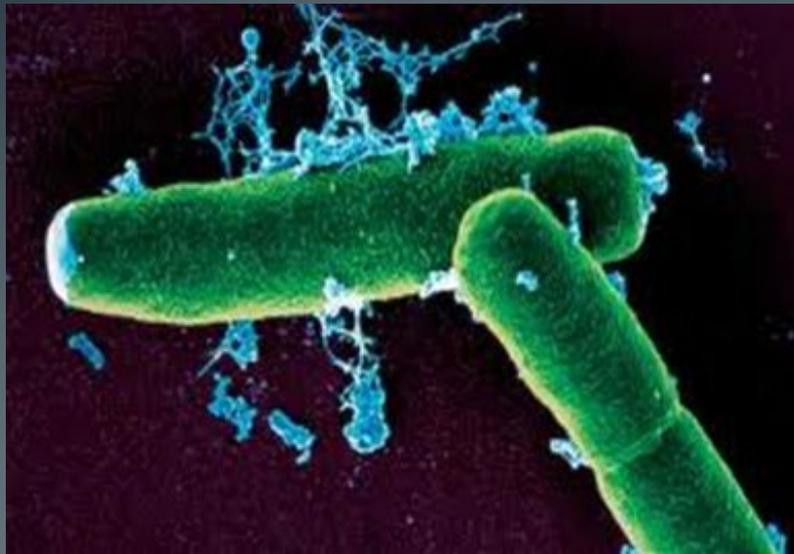
**Деструктивно изменен
ные споры, а также
споры в стадии
прорастания округлые и
диффузно потемневшие**

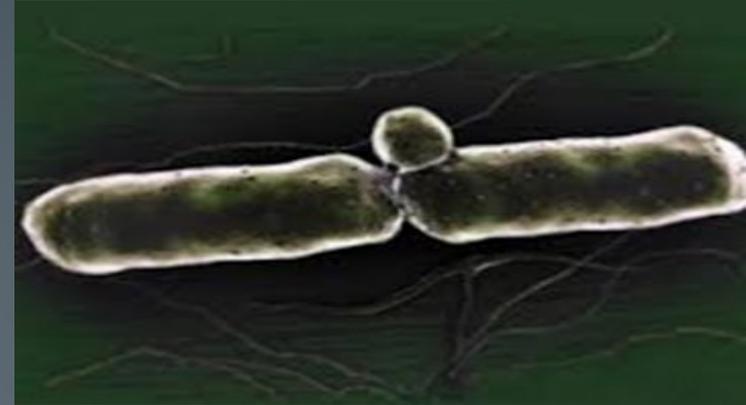
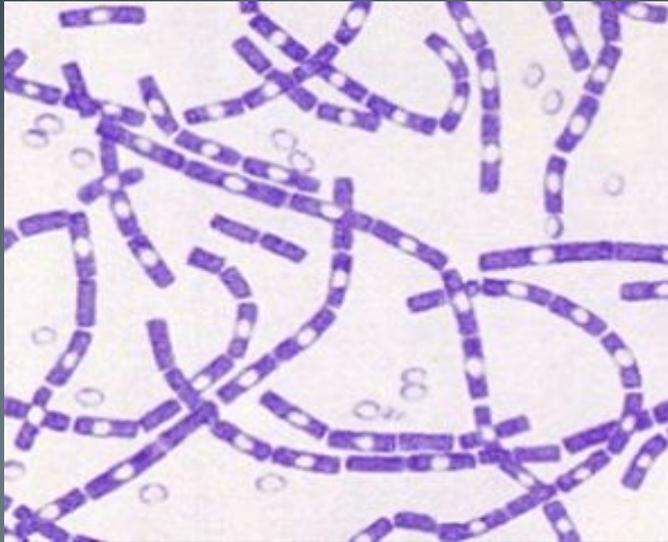
(б)



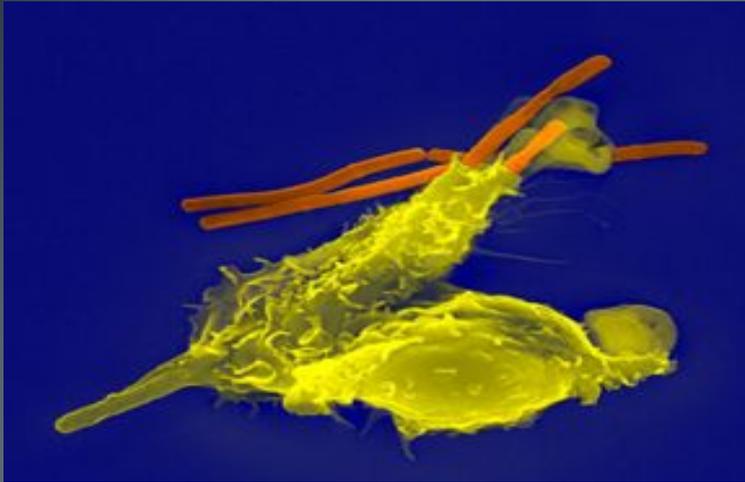


Споры возбудителя сибирской язвы чрезвычайно устойчивы к физическим и химическим воздействиям и сохраняют жизнеспособность в течение многих лет (клетка со спорами выделена розовым цветом). Фото © Dennis Kunkel Microscopy, Inc./Dennis Kunkel





При благоприятных условиях патогенные свойства спор сибирской язвы сохраняются более столетия. Именно эта особенность возбудителя сибирской язвы имеет важное эпидемиологическое значение и требует постоянного мониторинга стационарно-неблагополучных пунктов по сибирской язве.

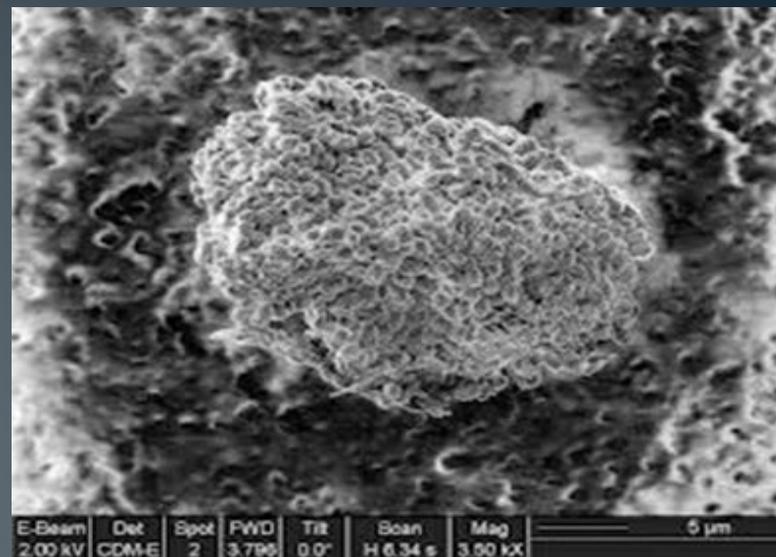


Нейтрофил, поглощающий возбудителя сибирской язвы. После разрушения клеточной стенки бактерии компоненты её цитоплазмы спровоцируют дальнейшее развитие иммунного ответа. (Фото [Science Photo Library](#).)



Возбудитель сибирской язвы. Изображение с сайта [extension.org](#)





**Возбудитель сибирской язвы
Bacillus anthracis, иллюстрация с
сайта freewebs.com**

**Микрофотографии сибирской
язвы**

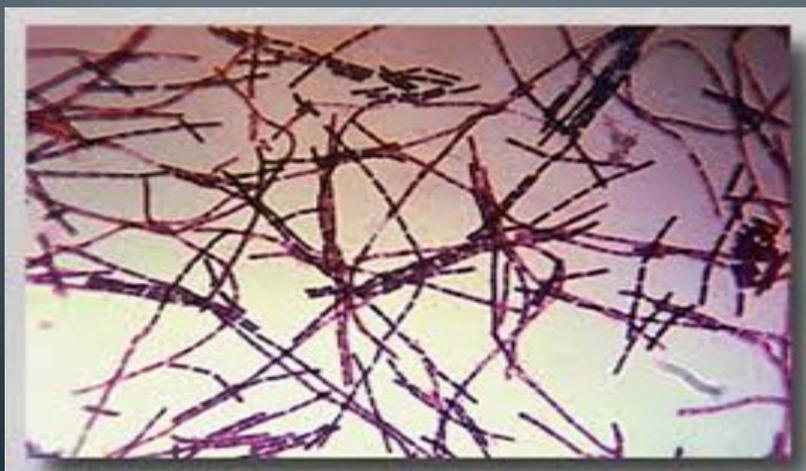


Рис. Ультраструктура капсулы клеток *B. anthracis* выращенных на бикарбонатном агаре в атмосфере углекислого газа в течении 48 ч.

Штамм 14/41. Фиксация глутаровым альдегидом и четырехокисью осмия. х30 (а, в, д); х40 000 (б, г).

а - бахромчатая капсула вокруг одиночной клетки

б.- в вокруг делящихся клеток. Г- отслоение биополимеров

д - объединение фибрилл капсулы в пучки, прикрепленные к клеточной стенке.

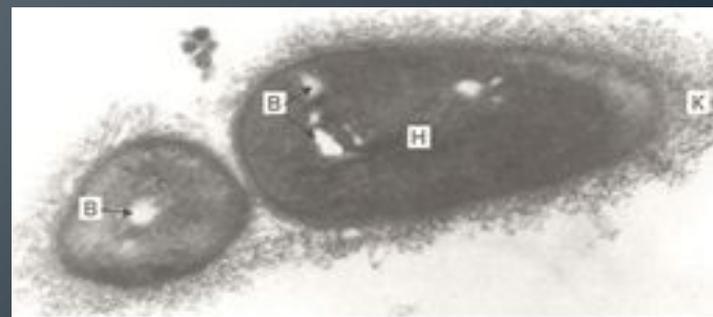
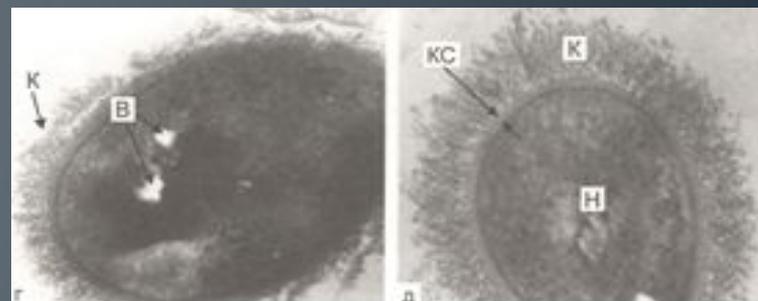
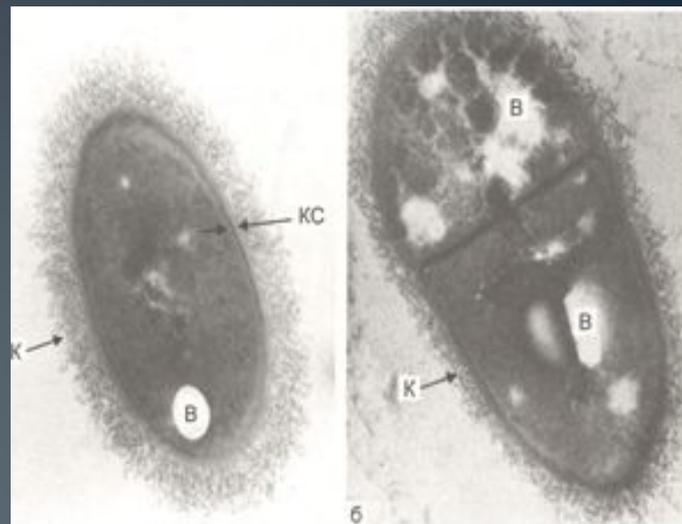


Рис. Цитохимические реакции с компонентами капсулы *B. anthracis*.

Штамм 14/41. x30 000 (а);
x20 000 (б); X10 000 (в); x60 000 (г).

а, б - контрастирование мукополисахаридов капсулы рутениевым красным;

в - альциановым синим;

г - контрастирование липидосодержащих комплексов малахитовым зеленым.

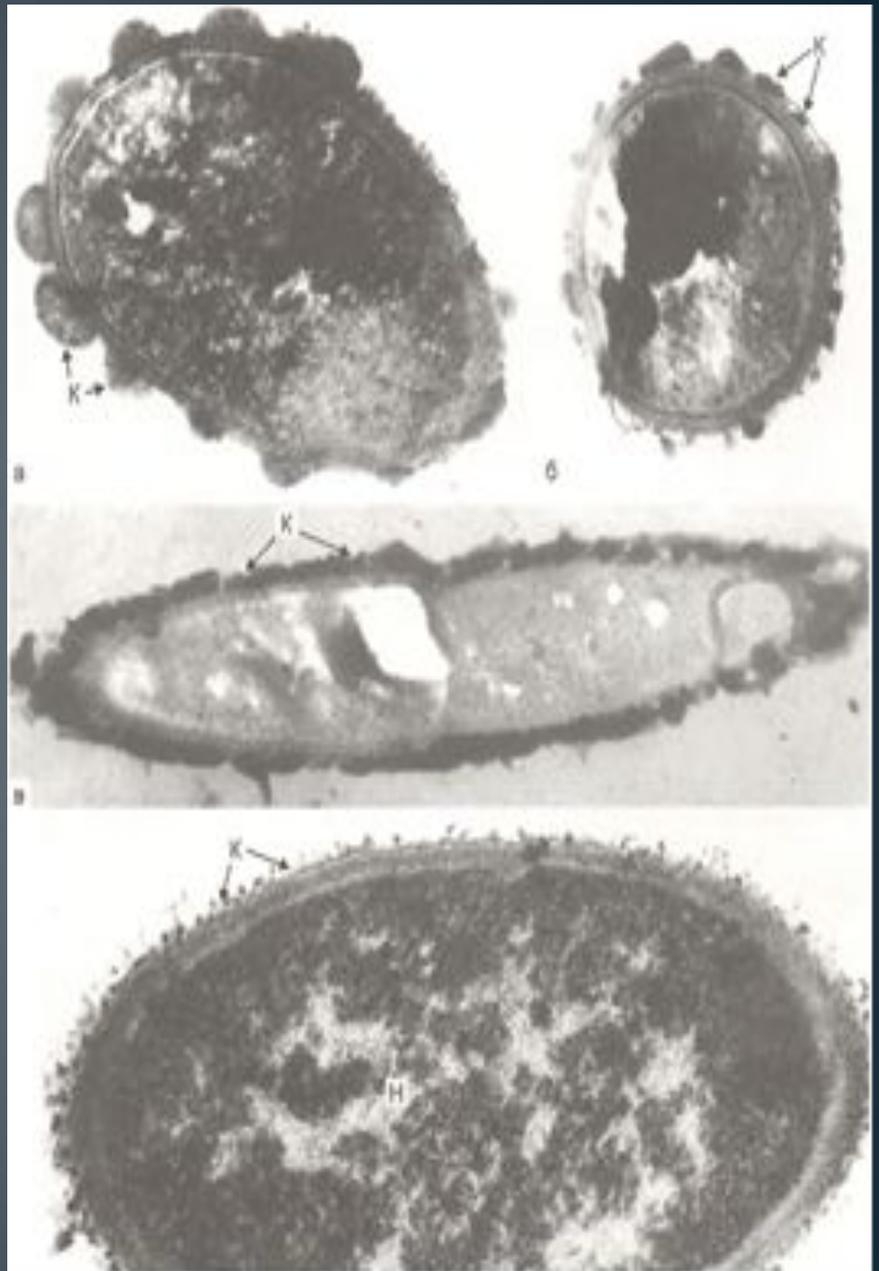
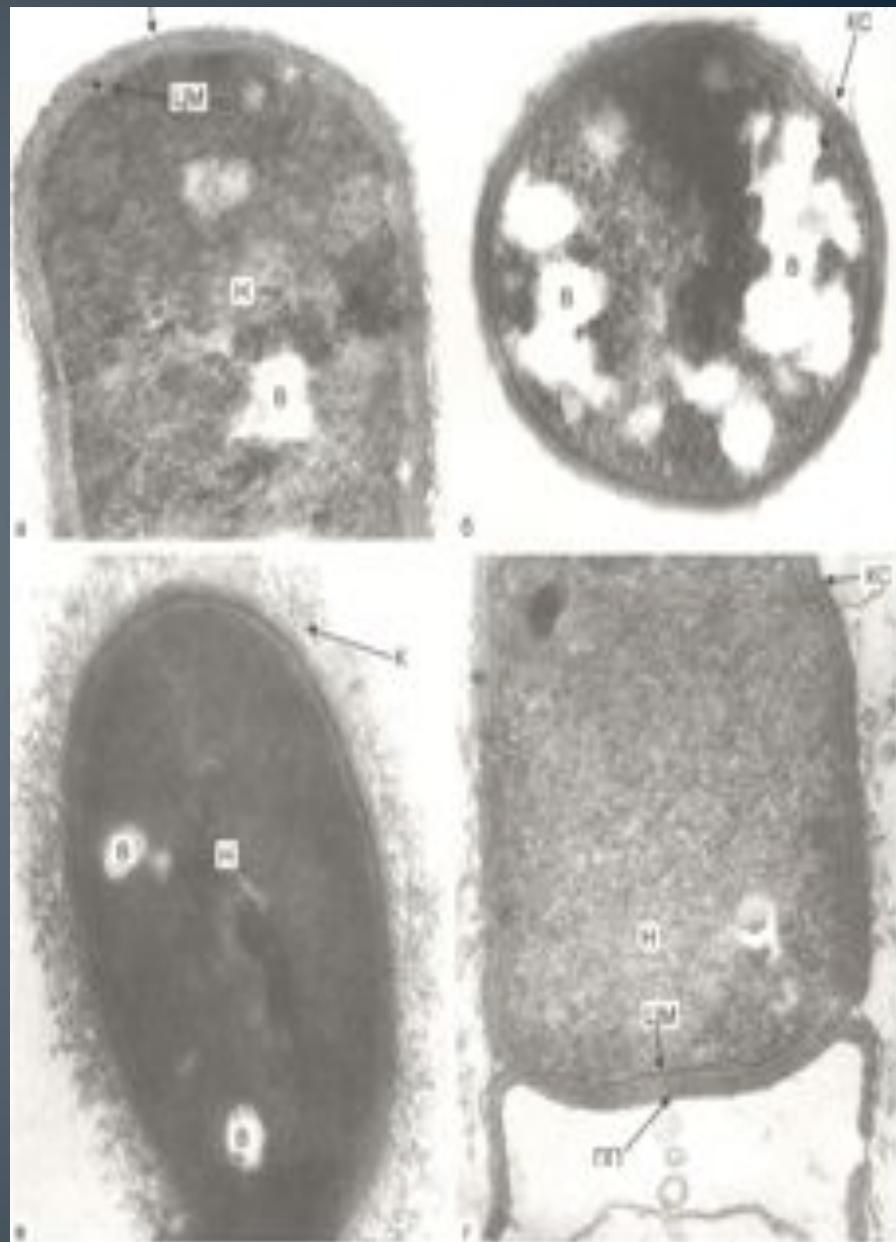


Рис. Варианты тонкого строения клеток *B. anthracis*, выращенных на агаре Хоттингера в течение 24 ч. Штамм Ч-7. х60 000 (а, б, г); х40 000 (в). Видны гомогенное (а, г) и двухслойное строение клеточной стенки (б, в).

У бескапсульных клеток с поверхности клеточной стенки происходит сдушивание образующих ее биополимеров (а, б, г).

Цитоплазматическая мембрана наиболее отчетливо заметна на полюсах и у поперечных перегородок (а, г).

В цитоплазме видны гранулы - полирибосомы, вакуоли, а также включения и нуклеоид.



**Рис. Варианты
ультраструктуры
цитоплазмы клеток *B.
anthracis*.**

Штамм Ч-7. хю 000 (а, б); х30
000 (в).

- а** - гипервакуолизация
цитоплазмы клеток;
- б** - осмиофильные
включения;
- в** - вакуоли, ограниченные
одноконтурными
мембранами.

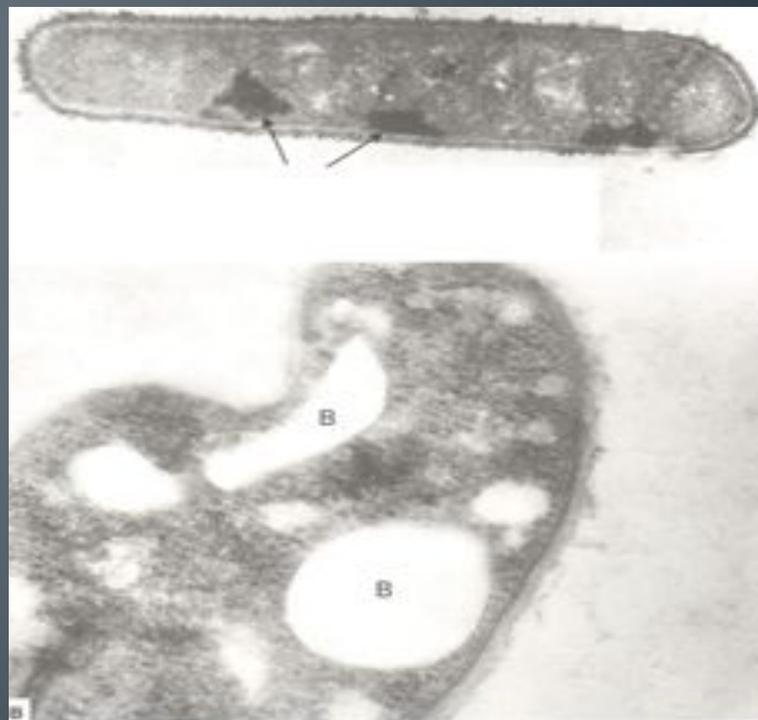


Рис. Деление сибиреязвенных микробов. Штамм 14/41. хГО 000.

Клетки делятся путем образования поперечных перегородок. Деление может быть равномерным с образованием равновеликих клеток (а) и неравномерным с формированием стрептобацилл (б, в).

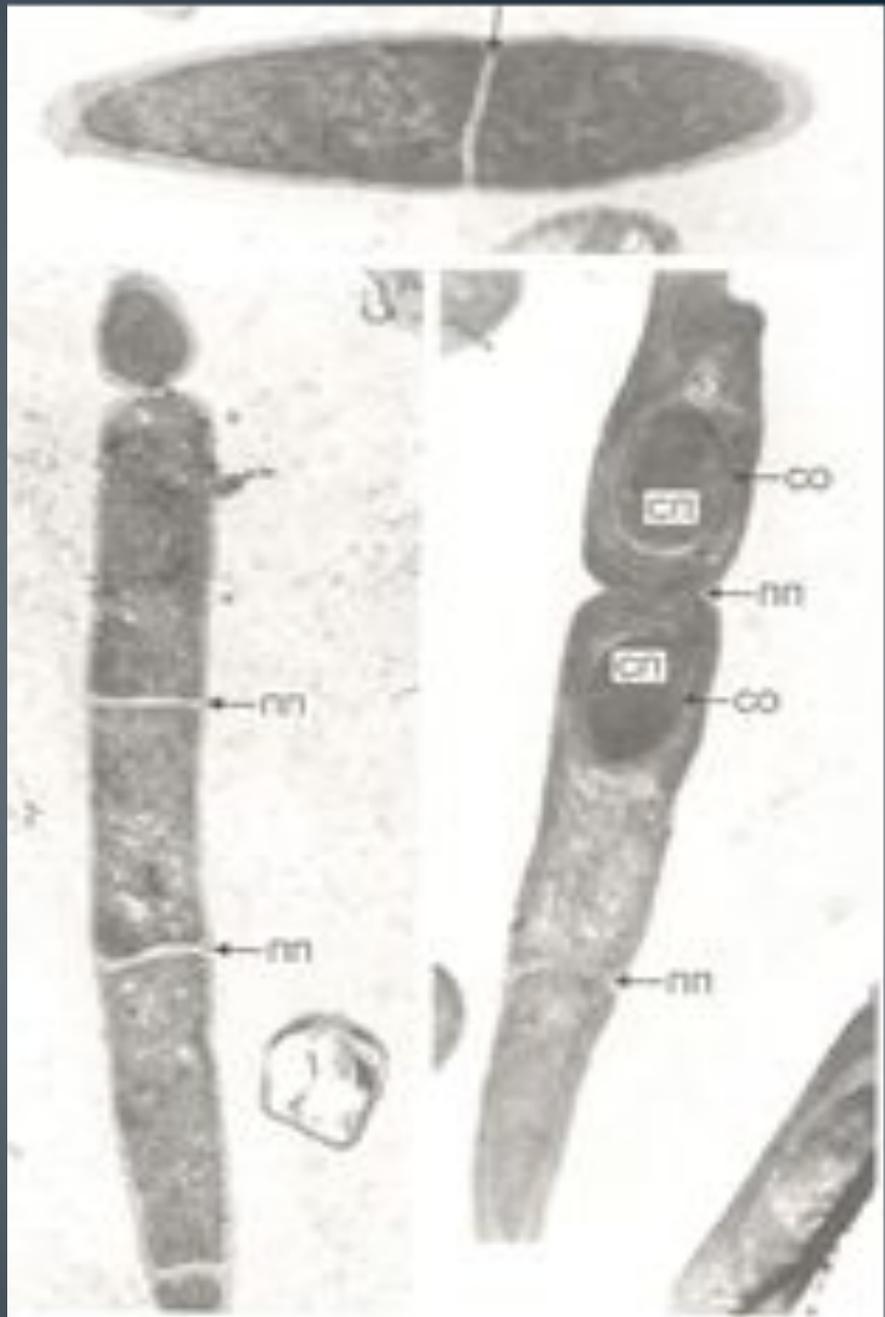


Рис. Формирование поперечных перегородок в делящихся клетках *B. anthracis*.

Условия выращивания - см. рис. 2.10. Штамм Ч-7. х60 000 (а, г); х40 000 (б, в).

а - инвагинация

цитоплазматической мембраны;

б - поперечная перегородка, состоящая из двух мембран, разделенных материалом клеточной стенки;

в - закладка электронно-плотного слоя;

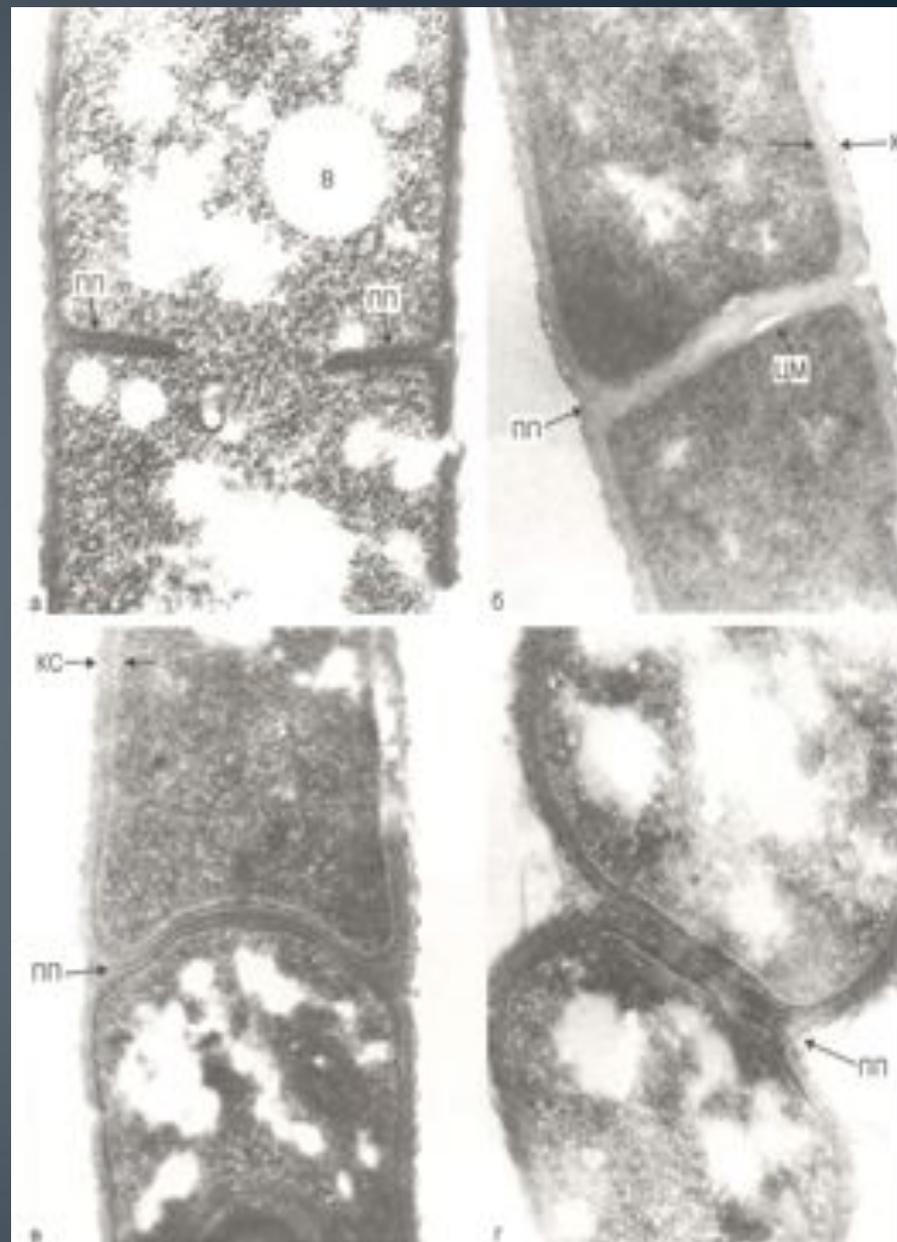


Рис. Ультраструктура соединительных отростков у клеток *B. anthracis*. Условия выращивания - см. рис. 2.10. Штамм Ч-7. x10 000 (а); x30 000 (б, г); x15 000 (в).

а - соединение отростком клеток стрептобациллы;
б - клетки и споры;
в - сохранение отростка на полюсе клетки после деления;
г - фрагменты отростков в межклеточном пространстве.

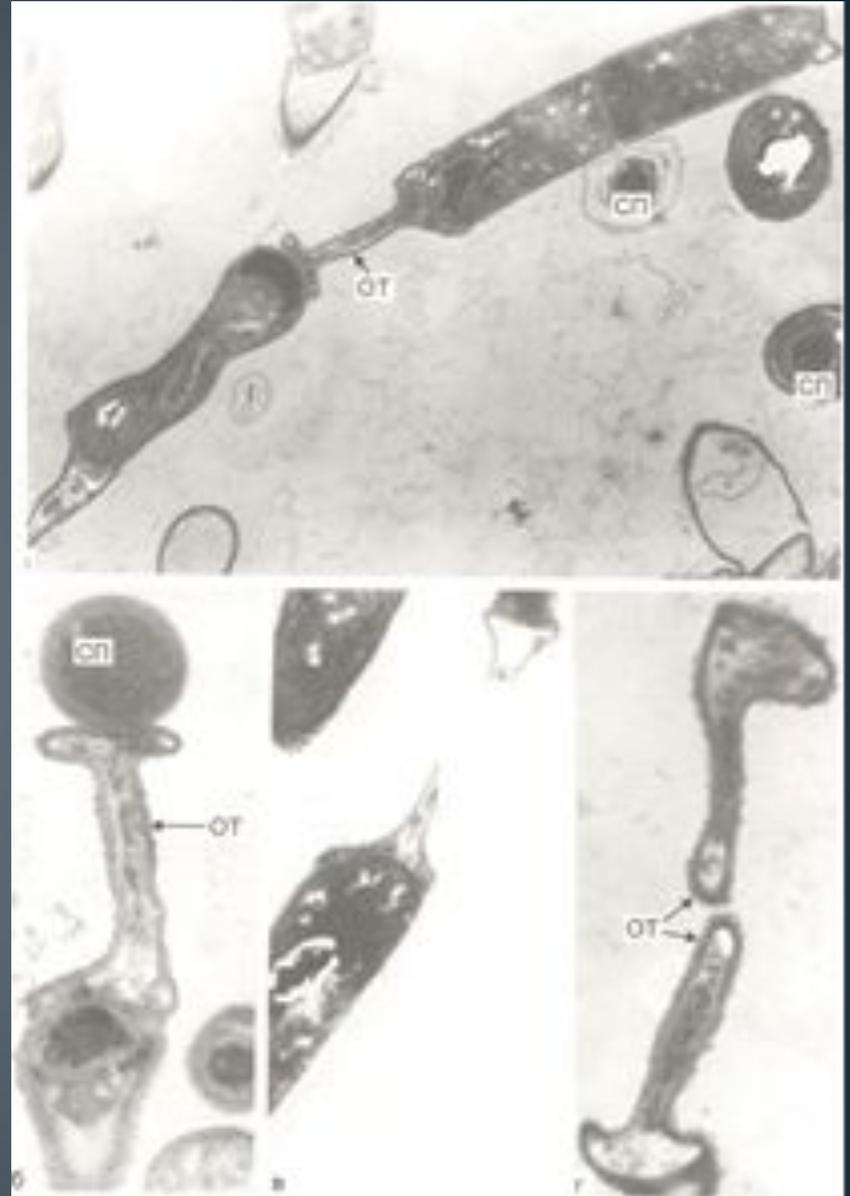


Рис. Спорообразование у *B. anthracis*, выращенных на агаре Хоттингера в течение 72 ч. Штамм 14/41. хзо 000 (а, б); х20 000 (в, г).

а - конденсация осмиофильного материала в зоне образования споры;
б - обособление предспоры цитоплазматической мембраной;
в - формирование кортекса, споровых оболочек и экзоспориума;
г - выход споры из

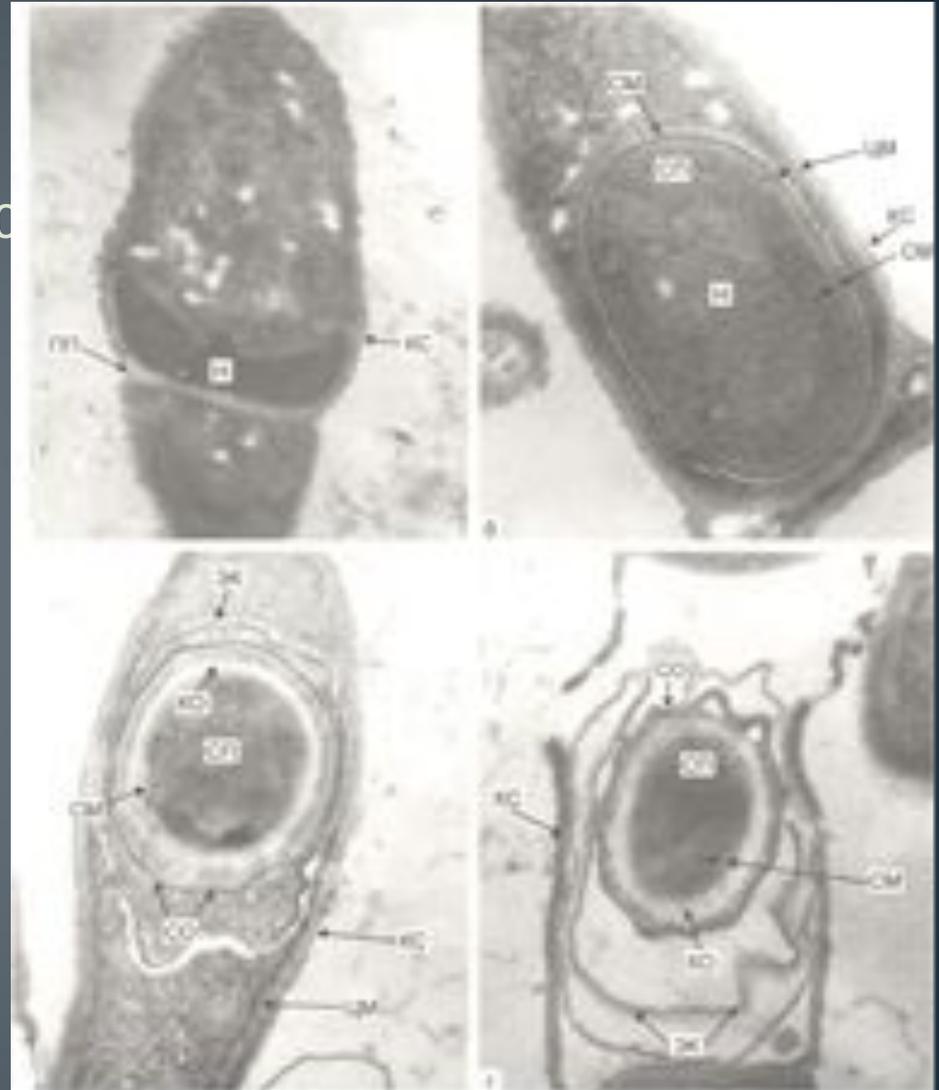


Рис. Внешний вид спор
возбудителя сибирской язвы
при электронной
микроскопии.

Штамм 14/41. $\times 10\ 000$.

а - оттенение хромом;

б - платино-углеродная
реплика.

**споры эллипсоидной
формы, на поверхности
имеют складки,** отличаются
высокой
электроннооптической
плотностью.



Рис. Варианты тонкого строения спор возбудителя сибирской язвы.

Штамм 14/41. x40 000 (а, в); x60 000 (б); x80 000 (г).

Созревание спор сопровождается уменьшением электронно-оптической плотности кортекса (а-в).

У зрелой споры ортекс электронно-прозрачный (б).

Компоненты спор:

**спороплазма,
споровая мембрана,
клеточная стенка,
кортекс,
споровая оболочка и экзоспориум.**

На наружной поверхности экзоспориума имеется **спой**

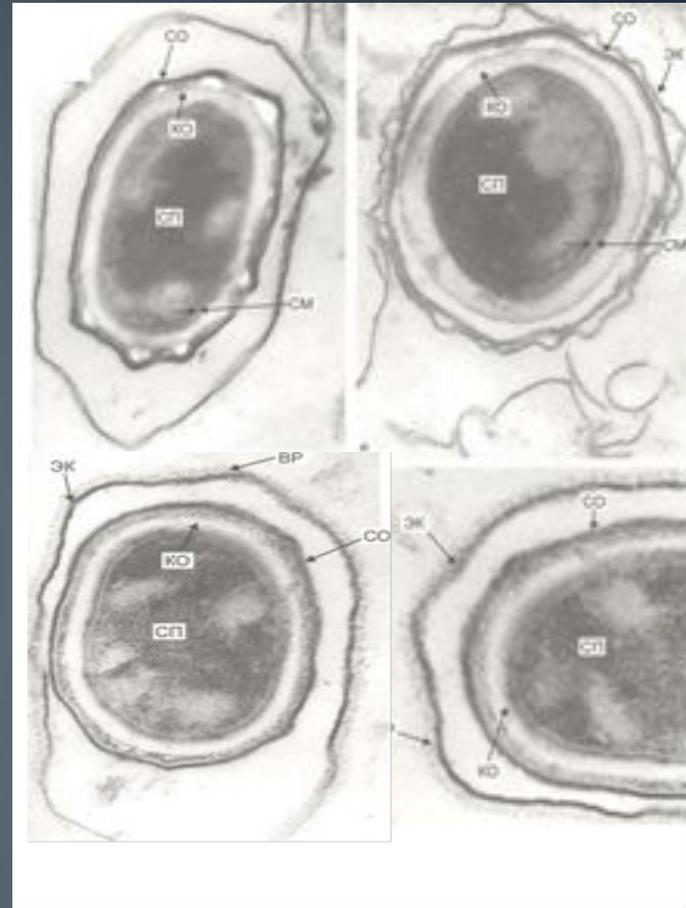


Рис. Микроколонии сибиреязвенных микробов, выращенных в течение 9 ч на агаре Хоттингера.

Микроколонии образованы нитевидными клетками, завитыми в несколько слоев. Фазовый контраст. x56.

а - штамм СТИ-1;

б - штамм 71/72.



Рис. Морфологические особенности колоний сибиреязвенных микробов, выращенных на агаре Хоттингера в течение 24 ч. Микрофотосъемка в падающем (а) и проходящем (б) свете. х13 (б). Вакцинный штамм СТИ -1.

а - визуально: **колонии матовые или серовато-белые;** **б** - при увеличении: поверхность их шероховатая, **центр бугристый коричневого цвета, края бахромчатые в виде плоской зернистой каймы**

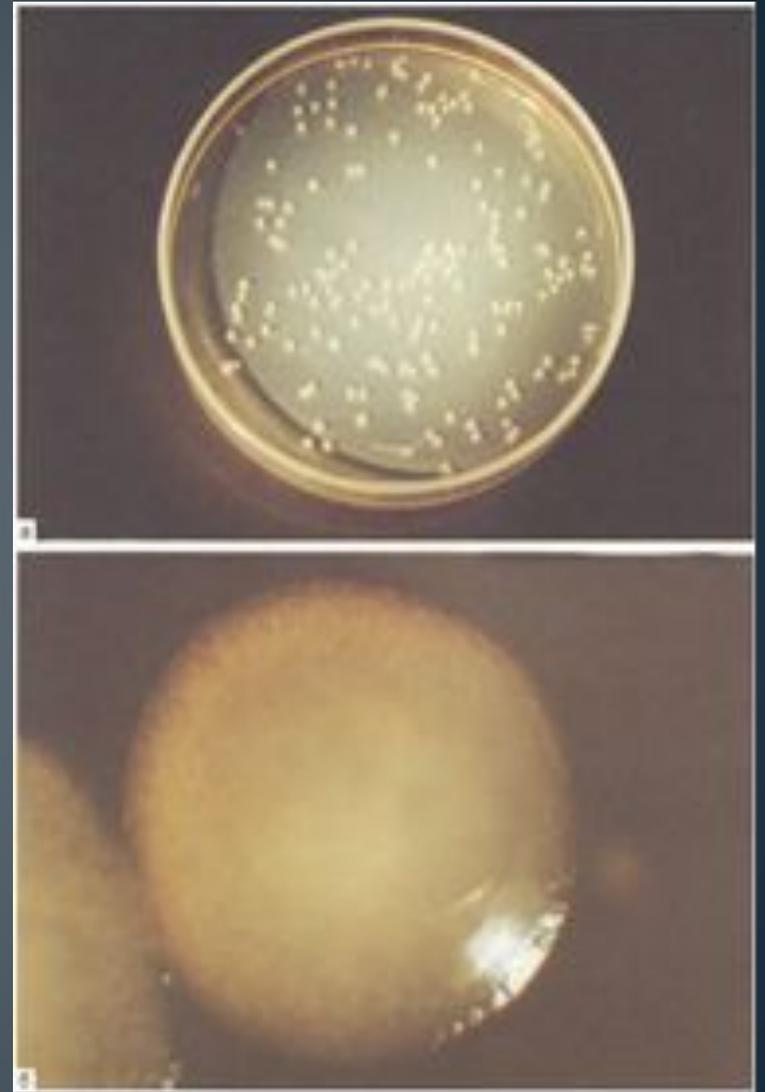


Рис. Морфологические особенности колоний капсульных бактерий возбудителя сибирской язвы.

Штамм вторая вакцина Ценковского. Инкубирование в течение 48 ч на бикарбонатном агаре в атмосфере углекислого газа. Микрофотосъемка в отраженном свете. x13 (б).

а - визуально: колонии в падающем свете напоминают жемчуг;

б - при увеличении: центр колоний выпуклый, периферия уплощенная, края ровные и округлые,





АНТИГЕНЫ:

1. КЛЕТОЧНЫЕ-

- -О - АНТИГЕН (ПОЛИСАХАРИД-ДЛЯ РЕАКЦИИ АСКОЛИ)
- -КАПСУЛЬНЫЙ АГ – АНТИФАГОЦИТАРНЫЙ

2. ТОКСИЧЕСКИЕ-

- - ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ (1ФАКТОР)
- - ПРОТЕКТИВНЫЙ (2ФАКТОР)
- - ЛЕТАЛЬНЫЙ – АЛЛЕРГЕН (3ФАКТОР)

ПАТОГЕННОСТЬ:

- **1.ЭКЗОТОКСИН, СОСТОЯЩИЙ ИЗ 3-Х КОМПОНЕНТОВ:** - ОТЕЧНЫЙ (аденилатциклаза- индуцирует образование цАМФ, повышает проницаемость сосудов и вызывает развитие отека), ЛЕТАЛЬНЫЙ (металлопротеаза - оказывает цитотоксическое действие, вызывает отек легких)ФАКТОРЫ И ПРОТЕКТИВНЫЙ АГ (обеспечивает проникновение отечного и летального компонентов токсина через мембрану в цитозоль и способствует синергидному эффекту действия других компонентов токсина, индуцирует выработку Ат-антитоксинов)

- субъединица А- (отечный и летальный факторы)

- субъединица Б – (протективный Аг)

- **2.КАПСУЛА** – белок

- **3.ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ-** гиалуронидаза, пламокоагулаза

- **4.ИНВАЗИЯ**

ТИПЫ ТОКСИНОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ ПО МЕХАНИЗМУ ДЕЙСТВИЯ:

- **1.ЦИТОТОКСИНЫ**

- **2.ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЛОКАТОРЫ**

ОСНОВНЫЕ ИСТОЧНИКИ ЗАРАЖЕНИЯ СИБ.ЯЗВЫ:

1.ТРАВОРЯДНЫЕ С/Х
ЖИВОТНЫЕ

2.РЕЖЕ ЗАЙЦЫ,
КОШОКИ,СОБАКИ

3.ПОЧВА,
КОНТАМИНИРОВАННАЯ
СПОРАМИ

ПУТИ ЗАРАЖЕНИЯ СИБ. ЯЗВЫ:

-КОНТАКТНЫЙ

-АЛИМЕНТАРНЫЙ

-ВОЗДУШНО-ПЫЛЕВОЙ

-ТРАНСМИССИВНЫЙ
(СЛЕПНИ, МУХИ-ЖИГАЛКИ)

Патогенез сибирской язвы



ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА:

ИССЛЕДУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

- **ОСНОВНОЙ ПРИНЦИП ДИАГНОСТИКИ СИБ. ЯЗВЫ:**
- **-ОБНАРУЖЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ**

содержимое везикул, карбункула, отторгнутый струп (кожная форма); мокрота (при поражении легких);

испражнения (при поражении кишечника);

кровь (при всех формах);

трупный материал (части пораженных органов и тканей, кровь и селезенка);

почва, кожа, шерсть животных, корм, вода, смывы с **объектов окружающей среды** и др.

Сибирская язва: причины и последствия

Сибирская язва - острое инфекционное заболевание, характеризующееся лихорадкой, интоксикацией. Протекает в виде кожной, редко кишечной, легочной и септической формы

Возбудитель



Возбудитель сибирской язвы – палочковидный неподвижный микроорганизм

- вне организма человека и животных образует споры
- споры могут сохраняться во внешней среде до 10 лет

Источник инфекции - домашние животные

Заражение – контактное и при употреблении в пищу продуктов, загрязненных спорами. Заражения человека от человека обычно не наблюдается

Сибиреязвенный менингит, легочная форма



летальность – 100%

Кишечная форма

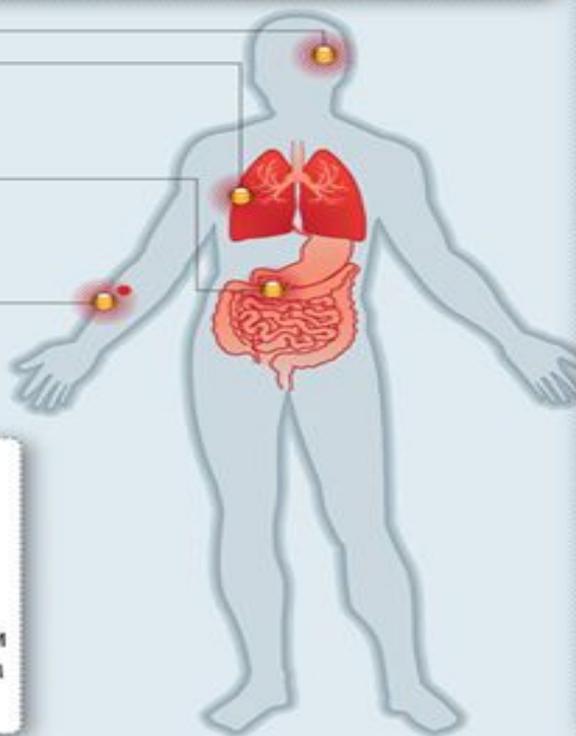


летальность – около 50%

Кожная форма



в отсутствие лечения
летальность – 10-20%



Профилактика

- сжигание трупов больных животных
- обеззараживание инфицированных объектов
- врачебное наблюдение за людьми, находившимися в контакте с больными животными или заразным материалом
- вакцинация людей и животных

Симптомы:

- поражение кожи, реже - внутренних органов
- инкубационный период от 2 до 14 дней

Течение:

- появление пятна красноватого цвета, зуд
- в течение суток уплотнение кожи, усиление зуда, образование одиночной везикулы
- на месте везикулы образуется язва с черным дном
- подъем температуры, расстройство аппетита
- отеки, образование сибиреязвенного карбункула
- возможно поражение лимфатической системы (лимфаденит)
- при благополучном течении болезни спустя 5-6 дней симптомы угасают, на месте язвы остается рубец
- при неблагоприятном течении – развитие вторичного сепсиса
- не исключен летальный исход

Лечение:

использование специфического противосибиреязвенного глобулина и антибиотиков



Механизм действия сибиреязвенного токсина:

1. Субъединица А:

- а) отечный фактор (аденилатциклаза) –индицирует образование цАМФ, повышает проницаемость сосудов и вызывает развитие отеков
- б) летальный фактор (металлопротеаза) – оказывает цитотоксическое действие, вызывает отек легких

2. Субъединица В (протективный Аг) – обеспечивает проникновение отечного и летального компонентов токсина через мембрану в цитозоль и способствует синергидному эффекту действия других компонентов токсина, индуцирует выработку антител (антитоксинов)

Клинические формы
сибирской язвы у
человека в
зависимости от места
внедрения
возбудителя:

- кожная
- легочная
- кишечная
- септическая

Клинические
проявления кожной
формы сибирской язвы
у человека:

В месте входных ворот
инфекции образуется
сибиреязвенный
карбункул, покрытый
темно-коричневым
струпом

Сибиреязвенные карбункулы





Сибиреязвенный карбункул на лице:

на фоне отека подкожной клетчатки в центре карбункула струп черного цвета, окруженный зоной воспаления (красного цвета).

**Выраженный отек
лица и шеи
больного с
эдематозной
разновидностью
кожной формы
сибирской язвы;
некроз в области
век правого глаза.**



ИММУНИТЕТ:

**Напряженный
стойкий**

**Активная
специфическая
профилактика
сибирской язвы у
человека:**

**Живая сибирезязвенная
вакцина вводится по
эпидпоказаниям.**

**Пассивная
специфическая
экстренная
профилактика и
терапия сибирской
язвы у человека:**

Противосибирезязвенный

Основной принцип
диагностики сибирской
язвы:

Обнаружение
возбудителя

Исследуемый материал
для диагностики:

содержимое везикул, карбункула,
отторгнутый струп (кожная
форма); мокрота (при поражении
легких);

испражнения (при поражении
кишечника);

кровь (при всех формах);
трупный материал (части
пораженных органов и тканей,
кровь и селезенка);

почва, кожа, шерсть животных,
корм, вода, **СМЫВЫ С ОБЪЕКТОВ**
окружающей среды и др.

МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

-МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ

-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ

-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ПРОБА (оценка вирулентных свойств на лаб.животных –капсула, LD50)

-АЛЛЕРГИЧЕСКИЙ (ПРОБА С АНТРАКСИНОМ)- *основные показания к использованию аллергического метода:* диагностика заболевания ретроспективная, эпидемиологическое исследование, отбор лиц для вакцинации.

-СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ – РИФ, РЕАКЦИЯ ТЕРМОПРЕЦИПИТАЦИИ АСКОЛИ.

Сибирская язва

Исследуемый материал:

Содержимое визикул, пустул, карбункула, язв, отторгнутый струп, кровь, мокрота, испражнения трупный материал (части пораженных органов и тканей, кровь, селезенка); почва, корм, вода, смывы с объектов внешней среды; мясо-продукты

Экспресс-методы:

РИФ, РНГА, РП (Асколи), ИФА, ПЦР;
Окраска по Граму, Романовскому, метиленовым синим, по Риббергу (капсула);
МФА (метод флюоресцирующих антител)

кожа, мех, шерсть животных,

Готовят суспензию, кипятят 5-10 мин, фильтруют

Реакция Асколи

Бактериологический метод

ПРОГРЕТЫЕ ПРОБЫ (80°C-20 мин)

Непрогретые пробы

ДДС

МПА, МПБ, среды Хоттингера, дрожжевые, сывороточные, казеиновые, ГКИ и др.

Чистая культура

Окр по Граму, Леффлеру, Риббергу

антибиограмма

РНГА

РИФ

Идентификация:

рост на МПБ, чувствительность к фагу, капсула *in vivo*, проба с пенициллином, тест на фосфатазу, лецитиназная активность, подвижность, гемолиз эритроцитов, ПЦР

Биологический метод

Биопроба на белых мышах

РИФ

РНГА

ИФА

Мазки-отпечатки, МФА

Окраска по Леффлеру, Риббергу (капсула)

Аллергический метод

Больной человек

Проба с антраксином

Способы сбора исследуемого материала

Материал	Способы сбора
Содержимое везикул, карбункула, отторгнутый струп	Кожу вокруг пораженного участка, поверхность карбункула осторожно обрабатывают ватным или марлевым тампоном, смоченным 70% спиртовым раствором. Затем содержимое везикулы отсасывают стерильным шприцем, отделяемое язвы снимают с поверхности стерильным тампоном, смоченным 0,9 % раствором натрия хлорида, фрагменты отторгнутого струпа снимают влажным тампоном или пинцетом
Мокрота	Собирают в стерильные широкогорлые банки
Испражнения	Тоже
Кровь	Берут стерильным шприцем из локтевой вены в объеме 1-2 мл 1-2 капли крови непосредственно у постели больного засевают на питательные среды (агар и бульон Хоттингера), одновременно делают 2-3 тонких мазка на предметных стеклах
Почва	Предварительно снимают верхний слой почвы (2-3 см). Пробы берут почвенным буром на глубине до 15 см, на территории скотомогильников - до 2 м
Вода	Из естественных и искусственных водоемов батометром берут 2 пробы по 0,5 л на глубине 10-15 см и у дна; также берут пробы придонного осадка у береговой кромки, исследуют, как воду
Смывы	Берут с площади 100 см ² тампоном, смоченным стерильной водой, который затем помещают в пробирку с 1-5 мл стерильной воды
Шерсть	Отбирают из разных мест не менее 5 образцов по 2 г каждый, при упаковке в кипы берут не менее 10 образцов из разных мест каж дой кипы
Кожа (шкурки)	Берут кусочки 3 x 3 см с незагнивших участков. При наличии на внутренней стороне шкурок инфильтратов и кровоподтеков про бы берут и в этих местах
Корма	<p><i>Концентрированные корма</i> (зерно, отруби, комбикорм): отбор проводят сухим стерильным шупом.</p> <p><i>Незатаренные</i>: первичные пробы отбирают из расчета 1 проба не менее 400 г на 4 м² по верхности, но не менее 5 проб от каждого закрома, партии; берут как из поверхностных, так и из глубоких слоев корма равномерно по всей площади.</p> <p><i>Затаренные</i>: пробы отбирают от каждой упаковочной единицы.</p> <p><i>Пробы грубых кормов</i> (сено, солома) берут при помощи пинцета и ножниц из разных мест скирды из расчета 1 проба (40 г) на 4 м² площади скирды. Так же отбирают зеленую массу.</p> <p><i>Корнеплоды</i> отбирают из расчета 1-3 штуки на 4 м² площади бурта, отсека. Скальпелем срезают поверхностный слой в местах с остатками земли.</p> <p><i>В лабораторию направляют усредненную пробу массой не менее 500 г, составленную из хорошо перемешанных пврвичных проб.</i></p>

Подготовка проб к исследованию

Материал	Способы подготовки проб
Трупный материал	Кусочки органов и тканей помещают в ступку, измельчают ножницами или пестиком, заливают 1-5 мл 0,9 % стерильного раствора натрия хлорида, суспензию через марлевый тампон набирают в шприц или пипетку и переносят в пробирку -
Почва	Пробы освобождают от корней, камешков и тщательно перемешивают. От каждой пробы берут 90-100 г в колбу, заливают 0,9 % раствором натрия хлорида или дистиллированной водой из расчета получения 15-20 мл суспензии. Колбу закрывают, тщательно встряхивают в течение 25 мин, дают отстояться 5 мин, надосадочную жидкость переносят в пробирку
Корма	Готовят аналогично
Вода	Чистая вода не требует предварительной подготовки. Воду с илистыми частицами фильтруют. С целью концентрирования пробы можно профильтровать через мембранные фильтры N2 3. Фильтрат смывают 1-2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, взвесь исследуют
Смывы	Тампоны отжимают о стенку пробирки и удаляют, оставшуюся жидкость подвергают исследованию
Шерсть	От каждой пробы шерсти отбирают наиболее загрязненные части, измельчают ножницами, помещают в колбу и заливают 0,9 % раствором натрия хлорида. Колбу закрывают, встряхивают 10- 15 мин и дают отстояться. Для удаления грубых частиц фильтруют через 2-3 слоя марли
Кожа (шкурки)	Кусочки массой в 1 г помещают в фарфоровую ступку и заливают 0,9 % раствором натрия хлорида. Кусочки измельчают ножницами и оставляют при 20 ос на 2-3 ч для размягчения материала затем тщательно растирают пестиком в той же жидкости до получения волокнистой мезги. Мезгу удаляют, предварительно отжав ее пестиком о стенку ступки

1-й день исследования

Подготовленные пробы из объектов внешней среды, шерсти и кожи для освобождения от посторонней микрофлоры **подвергают термической обработке** на водяной бане при 80 °C в течение 20 мин. **Не прогревают** пробы, **содержащие вегетативную форму** возбудителя сибирской язвы (материал от больных человека и животных, из патологического материала, мяса животных и др.).

Бактериоскопия (Мазки окрашивают по Граму, одним из методов для выявления капсулы - по Ребигеру, Гинсу, Михину или Романовскому - Гимзе и при ее наличии - сибиреязвенной люминесцирующей сывороткой (антисоматической или антиспоровой, в зависимости от вида пробы)

Посев

В зависимости от доставленного материала подготовленные для исследования пробы засевают на следующие питательные среды.

Желательно использовать 5-10 чашек на пробу, посев производить с помощью шпателя, при посеве загрязненного материала применять метод истощения. Посевы инкубируют в термостате при 36-37 °C в течение 18-20 ч.

Биологическая проба.

Подготовленный для исследования материал, вводят подкожно во внутреннюю поверхность бедра

двум белым мышам в количестве 0,2-0,5 мл и двум морским свинкам - по 0,5-1 мл. **Животные погибают через 1-3 дня**, иногда позже, от септицемии, на месте введения наблюдаются **отек и гиперемия**.

Наблюдение за выжившими животными ведут в течение 10 сут.

Ускоренный биологический метод.

Этот метод предложен Э. Н. Шляховым для сокращения сроков

бактериологического анализа. **Исследуемый материал вводят**

внутрибрюшинно 6 белым мышам по 0,5 мл. Через 1 и 2 ч вскрывают по паре мышей, из перитонеального экссудата и крови сердца делают мазки, из селезенки и печени - **мазки**

отпечатки. Мазки фиксируют, **окрашивают** по Ребигеру и капсульно - соматической люминесцентной сибиреязвенно сывороткой, **микроскопируют**. **Проба считается**

положительной при наличии в мазках типичных капсульных

бацилл. Параллельно производят посевы на питательные

2-й день исследования

просмотр посевов и колоний на средах.

Отбирают не менее 10 шероховатых

колоний. Из всех отобранных колоний **делают мазки** для окраски

по Граму и сибиреязвенной соматической люминесцирующей сывороткой. **И делают посевы на скошенный агар или сектора для**

выделения чистой культуры, на дифференциально - диагностическую среду

Посевы на дифференциально-диагностическо среде перед просмотром обрабатывают парами

аммиака. Для этого на фильтровальную бумагу в отдельную крышку от чашки Петри наливают 1-2 мл

водного аммиака (29 %, концентрированного). Затем

чашку с посевом помещают на несколько секунд (пока не порозовеют колонии сапрофитов) в крышку

с аммиаком. В отличие от спорообразующих сапрофитов сибиреязвенный микроб не образует фосфатазу, вследствие чего его колонии цвета не изменяют. С дифференциально-диагностической среды для идентификации отбирают колонии, не изменившие своего цвета после обработки парами аммиака.

Посевы инкубируют в термостате 18-20 ч.

Осматривают лабораторных животных.

Павших животных вскрывают, делают **мазки - отпечатки,**

которые фиксируют, окрашивают и

3-й день исследования

Просматривают посевы. Для дальнейшей идентификации отбирают культуры, не дающие гемолиза, не изменяющие своего цвета после обработки парами аммиака, формирующие характерный «комочек ваты» в МПБ.

Проверяют на чистоту роста в мазке и ставят идентификационные тесты.

Подвижность устанавливают в «висячей капле» или при посеве уколом в полужидкий агар,

Тест «жемчужного ожерелья»-

модифицированный ускоренный вариант. **К бульону Хоттингера** (pH 7,2-7,3) добавляют 20

% инактивированной лошадиной сыворотки и

0,5 ЕД/мл пенициллина. Среду разливают с соблюдением стерильности по 2-3 мл в **пробирки и засевают** в нее по 2 капли **бульонной или петлю агаровой культуры,**

отобранной для идентификации. Посевы инкубируют не более 3 ч при 37 ос. **Затем делают мазки, фиксируют их, окрашивают метиленовым синим и микроскопируют.**

В мазках сибиреязвенные бациллы обнаруживаются в виде цепочки шаров, напоминающих жемчужное ожерелье, результат воздействия пенициллина на клеточную стенку микроба.

Спорообразующие сапрофиты, как правило, к пенициллину

При классическом варианте постановки теста «жемчужного ожерелью) изучаемые 3-4-часовые бульонные культуры наносят по 1 капле на 3 пластинки питательного агара: **две с добавлением пенициллина** в конечной концентрации 0,5 и 0,05 ЕД/мл и **третья**

контрольная - без антибиотика.

Посевы инкубируют при 37°С. Не позже 3 ч инкубации **просматривают рост с сухой**

(х40) и иммерсионной (х90) фазово-контрастными системами под микроскопом, предварительно накрыв

каждый участок нанесения культуры покровным стеклом. **В положительном**

Тест с сибиреязвенным бактериофагом.

Сибиреязвенный микроб лизируется сибиреязвенными фагами. Пробу ставят на свежеприготовленных и хорошо подсушенных чашках с агаром Хоттингера. или МПА. Дно чашки расчерчивают на квадраты, 5-6- часовую

бульонную культуру наносят петлей или пипеткой, подсушивают в термостате, затем в центр подсушенной капли наносят петлей каплю цельного сибиреязвенного бактериофага.

Посевы инкубируют при 37°С. Результат учитывают через 5-6 ч под малым увеличением микроскопа и через 12-24

и невооруженным глазом. **В**

Продолжение 3-го дня

Наличие капсулы можно определить несколькими способами:

путем посева культур на 1 % бикарбонатный агар и инкубацией при 37 °C

в анаэрокате при содержании 10-50 % CO₂ или в эксикаторе. Через 18-24 ч капсулообразующие культуры вырастают в виде крупных слизистых колоний.

В мазках, окрашенных по Ребигеру и капсульно-соматической сибиреязвенной

люминесцирующей сывороткой, видны цепочки палочек, окруженных капсулой;

путем посева в жидкую питательную среду ГКИ, состоящую из 40 % инактивированной бычьей или лошадиной сыворотки и 60 % раствора Хенкса.

Пробирки закрывают стерильными резиновыми пробками и инкубируют при

37 °C. Через 16-18 ч большинство сибиреязвенных клеток образуют капсулу,

которая выявляется при микроскопии окрашенных мазков;

Продолжение 3-го дня

Гемолиз эритроцитов барана

изучают на МПА или агаре Хоттингера с 3-5 %

дефибринированной крови барана. Культуры засевают петлей на сектора агара.

Результат учитывают через 18

20 ч инкубации при 37 Ос.

Сибиреязвенный микроб в отличие от спорообразующих сапрофитов **не лизирует**

Лецитиназную активность

определяют в жидкой желточной среде или на агаре Хоттингера с добавлением куриного желтка.

Сибиреязвенный микроб не свертывает желток в жидкой среде в течение нескольких суток инкубирования. При росте **на плотной среде** вокруг колоний сибиреязвенного микроба мутная белая зона не образуется.

- Кроме того, определяют вирулентность и антибиотикограмму выделенных культур.

Для определения вирулентности атипичных штаммов используют кроликов породы шиншилла. При постановке пробы с антибиотиками обязательно используют диски с пенициллином, тетрациклином и рифампицином, что служит еще одним дифференциальным признаком, так как близкородственные спорообразующие сапрофиты к

ним устойчивы.

Лабораторных животных осматривают, павших вскрывают и исследуют.

4-й день исследования

Учитывают результаты идентификационных тестов.

Продолжают наблюдение за выжившими биопробными

Животными. В течение 10 сут. Затем их забивают,
вскрывают и

Исследуют.

Ставят реакцию Асколи

Реакцию термореципитации по Асколи проводят **с целью**
обнаружения сибиреязвенного антигена.

Идентификация выделенной культуры

- - рост на МПБ
- - чувствительность к сибиреязвенному бактериофагу
- - капсула *in vitro*
- - проба с пенициллином
- - тест на фосфатазу
- - лецитиназная активность
- - подвижность
- - гемолиз эритроцитов
- - ПЦР
- - Определение чувствительности к антибиотикам

Реакции для обнаружения Аг сибирской язвы в исследуемом материале (ткани погибших животных – шкура, кожа и трупный материал от человека):

1. РИФ

2. Реакция АСКОЛИ (термопреципитации) с использованием преципитирующей сибиреязвенной сыворотки

Характеристика Аг, выявляемого в реакции Асколи:

Термостабильный соматический сибиреязвенный Аг полисахаридной природы

Реакция термопреципитации по

Асколи

Реакцию термопреципитации по Асколи ставят при массовом загрязнении посторонними микробами исследуемого материала (кожа, шерсть, органы трупа).

Компоненты реакции:

- а. антиген - прозрачный, растворимый, термостабильный.
- б. противосибиреязвенная сыворотка.

Реакция ставится в 2-х преципитационных пробирках. В преципитационную опытную пробирку наливают 0,5 мл преципитирующей сибиреязвенной сыворотки и на нее с помощью пастеровской пипетки наслаивают полученный фильтрат (антиген). **При наличии антигена** в исследуемом фильтрате на границе двух жидкостей образуется кольцо преципитации. В контрольной пробирке вместо преципитирующей сыворотки

реакция Асколи

Для этого измельчают кусочки органов трупа, кожи, шерсти животных и **кипятят** в физиологическом растворе 10-15 мин. Полученный термоэкстракт **фильтруют**.

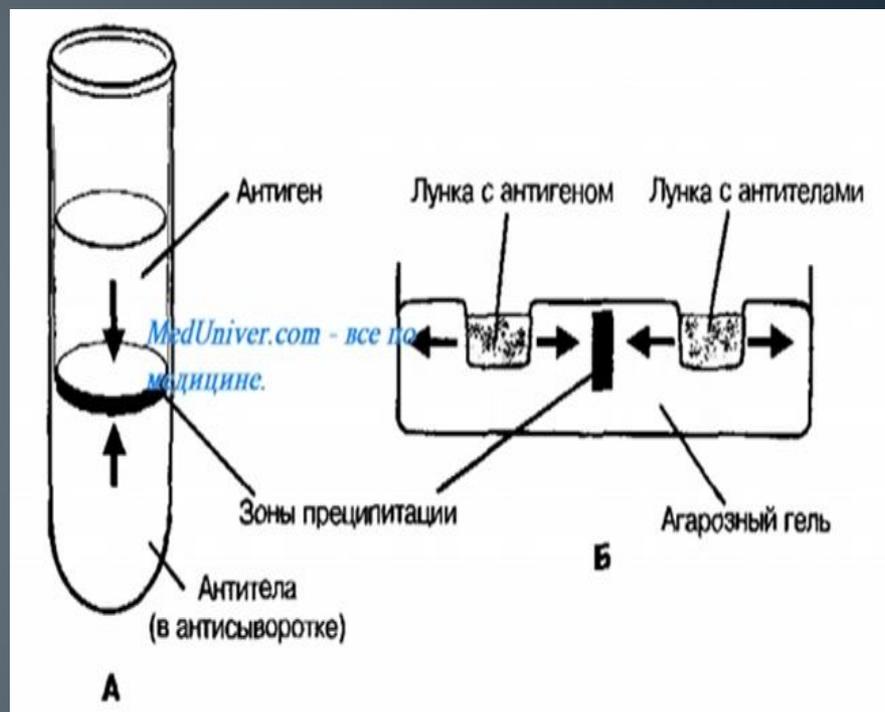
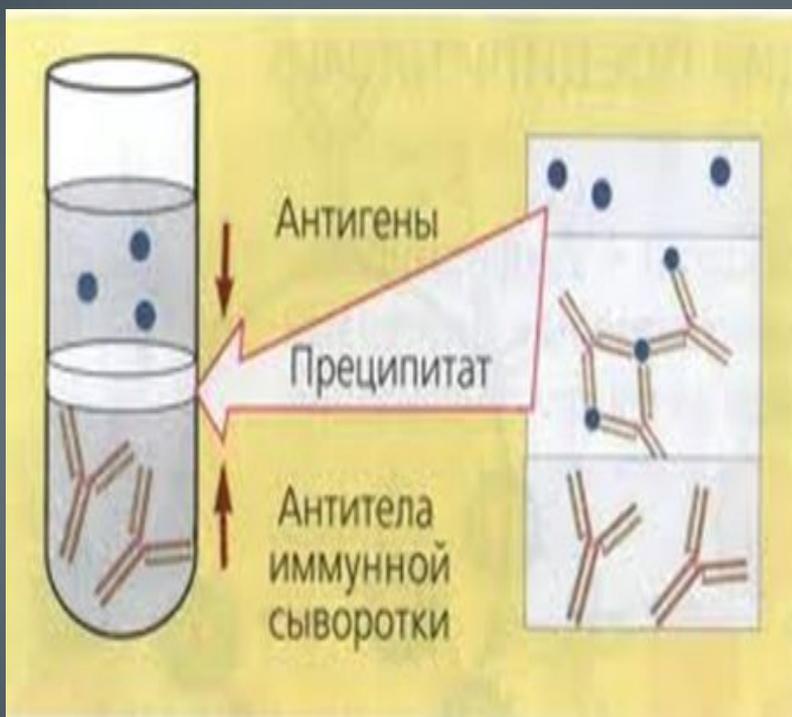
Фильтрат наслаивают на преципилирующую

сыворотку, разлитую в узкие пробирки. В положительных случаях на границе обеих жидкостей появляется мутно-белое кольцо преципитации.

**Способ извлечения
Аг из исследуемого
материала для
реакции
термопреципитации
Асколи:**

**Экстракция путем
кипячения**

Выявление АГ в реакции преципитации. Схемы реакций кольцепреципитации (А) и диффузии в геле (Б).



Реакцией кольцепреципитации также выявляют АГ к бруцеллам в молоке (кольцевая проба Банга).

Постановка реакции Асколи

В узкую пробирку для преципитации наливают иммунную преципитирующую противосибирезвенную сыворотку и осторожно наслаивают на нее испытуемый экстракт.

В течение ближайших 10 мин на границе между сывороткой и экстрактом в положительных случаях появляется кольцо помутнения (кольцепреципитация). Асколи реакция очень чувствительна и специфична.

С ее помощью удастся быстро выявить материалы, инфицированные сибирской язвой.

Полученные результаты проверяются **контрольными** пробами (см. табл.)

В пробирках № 4, 5, 6 и 7 кольца помутнения отсутствуют. А. р. можно ставить по сокращенной схеме: пробы 1, 2, 5 и 6.

№ пробирки (пробы)	Содержимое пробирки
1	Преципитирующая сыворотка + экстракт из исследуемого материала
2	Преципитирующая сыворотка + экстракт из селезенки заведомо сибиреязвенного животного
3	Преципитирующая сыворотка + экстракт из агаровой культуры бацилл сибирской язвы
4	Преципитирующая сыворотка + экстракт из материала, взятого от здорового животного
5	Преципитирующая сыворотка + физиологический раствор NaCl
6	Нормальная сыворотка + экстракт из исследуемого материала
7	Нормальная сыворотка + экстракт из селезенки заведомо сибиреязвенного животного
8	Нормальная сыворотка + физиологический раствор NaCl

Критерии идентификации ЧК палочки сибирской язвы в бактериологическом методе диагностики

1. МОРФОЛОГИЯ

2. БИОХИМИЧЕСКИЕ Свойства

3. ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ФАГУ

4. ОЦЕНКА ВИРУЛЕНТНЫХ СВОЙСТВ (КАПСУЛА , LD50).

**ПРИЗНАКИ, ОТЛИЧАЮЩИЕ ПАЛОЧКУ СИБ ЯЗВЫ
ОТ ГРАМ(+) САПРОФИТОВ (АНТРАКОИДЫ И Т.Д.-
B.cereus, *B.subtilis*):**

- НАЛИЧИЕ КАПСУЛЫ
- НЕПОДВИЖНОСТЬ
- ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К СИБ.ЯЗВЕННОМУ ФАГУ



- ПАТОГЕННОСТЬ ДЛЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ
(МЫШИ, СВИНКИ, КРОЛИКИ)

Включите видео!!!!



Bacillus anthracis and B. cereus:

Murray: *Medical Microbiology, 501 Edition, Chapter 25*

(CASE STUDIES – изучаемое дело)

Two days after shearing sheep, a shepherd notices a papule on his arm, which rapidly progresses to an ulcer and then a necrotic eschar. Lymphadenopathy and edema develop: cutaneous anthrax

Three months after visiting a sheep farm, a man develops fever, cough, shortness of breath, headache, vomiting, chills, and chest pain. These progress to edema, swelling of mediastinal lymph nodes, shock, and death within 3 days: **inhalation anthrax**

(TRIGGER
WORDS -
ключевые
слова)

Sheep

Goat

Fur

Spore

Bioterror

Wool-
sorter's
disease

(_ESSENTIAL FACTS – ОСНОВНЫЕ факты)

- Anthrax is usually associated with animal fur and is an occupational hazard for butchers, goatherds, sheepherders, and sheepshearers.
- **Virulence is plasmid encoded:** Enzymes for the poly-D- glutamic acid capsule
- Three plasmid encoded **exotoxins:** Edema toxin-adenylate cyclase; lethal toxin-zinc metalloprotease; protective antigen

(STUDY BREAK- экспресс - исследование)

Anthrax spores are extremely resistant to inactivation and may remain viable for millennia (e.g., in Egyptian tombs). Anthrax spores have been developed as a prime bioterror agent and were sent through the U.S. mail to terrorize legislators, reporters, and others.

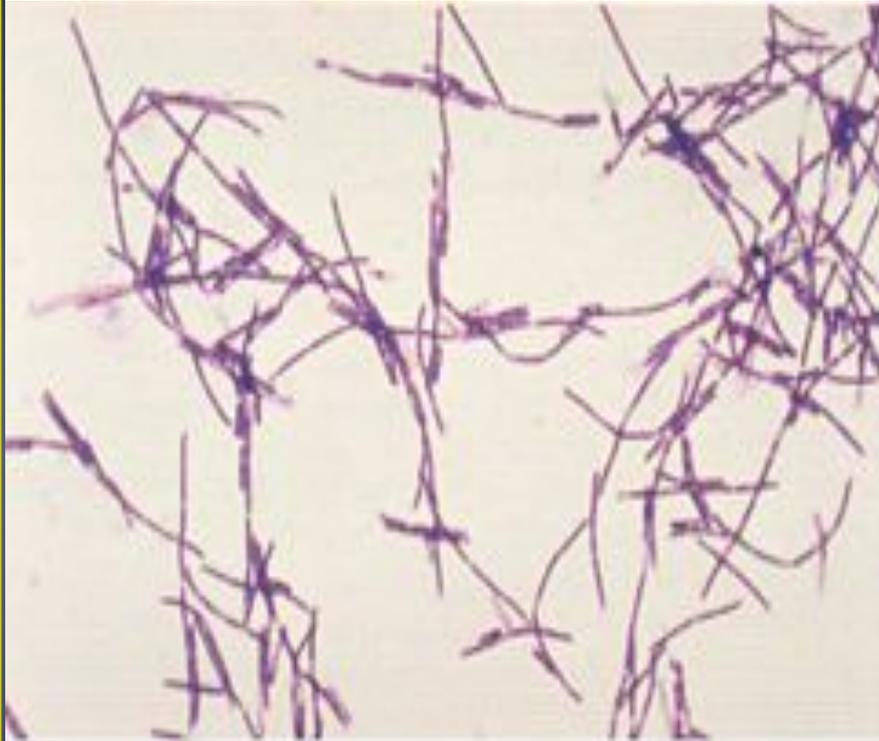


Figure 1. Gram stain of
B. anthracis



Figure 2: Anthrax on the forearm, as
would be observed for a butcher,
shepherd, or another at risk of
infection

Bacillus anthracis

(STRUCTURE- строение)

(+)

- Gram-positive rod in long chains, spore forming, polypeptide capsule

(LAB ID лабораторное подтверждение)

- Growth characteristics and Gram stain

(VIRULENCE FACTORS – факторы вирулентности)

- Polypeptide capsule, exotoxins: Edema toxin-adenylate cyclase; lethal toxin-zinc metalloprotease; protective antigen

(DISEASES - заболевания)

- Cutaneous anthrax

Bacillus anthracis

(EPIDEMIOLOGY - эпидемиология)

- Commonly found in fur of herbivores and in soil. Spores are viable for a long time and are difficult to inactivate.

(PREVENTION - профилактика)

- Vaccination of animals

(TREATMENT - лечение)

- Ciprofloxacin

V. cereus:

(TRIGGER WORDS –ключевые слова)

Rice Preformed toxin

Heat-stable toxin-vomiting Heat-labile toxin-diarrhea

(STRUCTURE - строение) (+)

Gram-positive rod, sporulates

Lab ID – лабораторное подтверждение

Isolation of organism from contaminated food

B. cereus:

**(VIRULENCE FACTORS – факторы
вирулентности)**

Gastroenteritis :

Heat-stable enterotoxin—emesis

Heat-labile enterotoxin—diarrhea

Ocular: necrotic toxin, cereolysin,
phospholipase C

V. cereus:

(DISEASES - заболевания)

- Emetic form gastroenteritis: ingestion of heat-stable toxin from contaminated rice.
- Like *S. aureus* gastroenteritis, the incubation period is 1-6 h. The individual is being poisoned by preformed toxin.
- Diarrheal form gastroenteritis: bacterial growth in gut produces toxin; sources are contaminated rice, meat, vegetables, and sauces.
- Ocular infections after trauma

B. cereus:

(EPIDEMIOLOGY - эпидемиология)

- **Food-borne disease, rice and rice dishes**

(PREVENTION - профилактика)

- **Proper food storage**

(TREATMENT- лечение)

- **Symptomatology**

Thank you for the work labor!!!