

# **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 бактерий  
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.

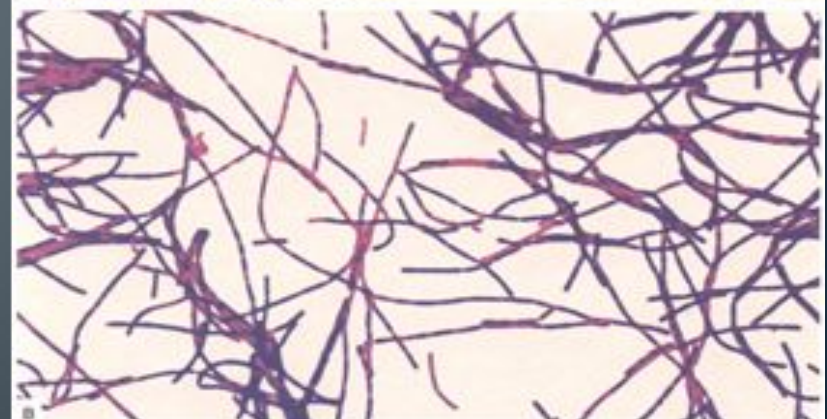
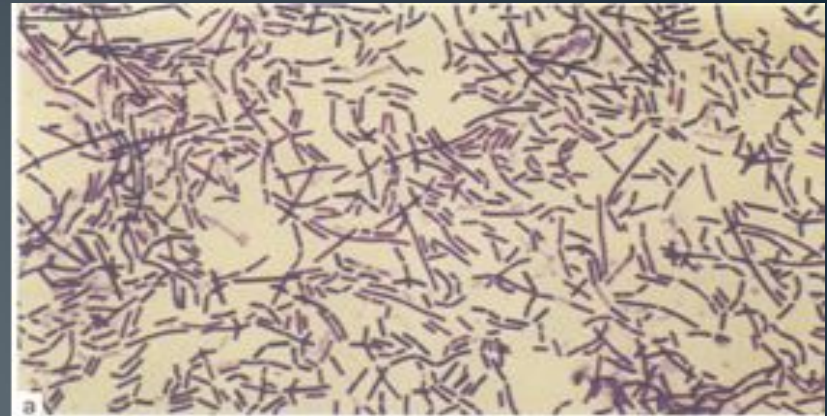
**Микробы расположены поодиночке, попарно или соединены в нити и цепочки.**

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.**

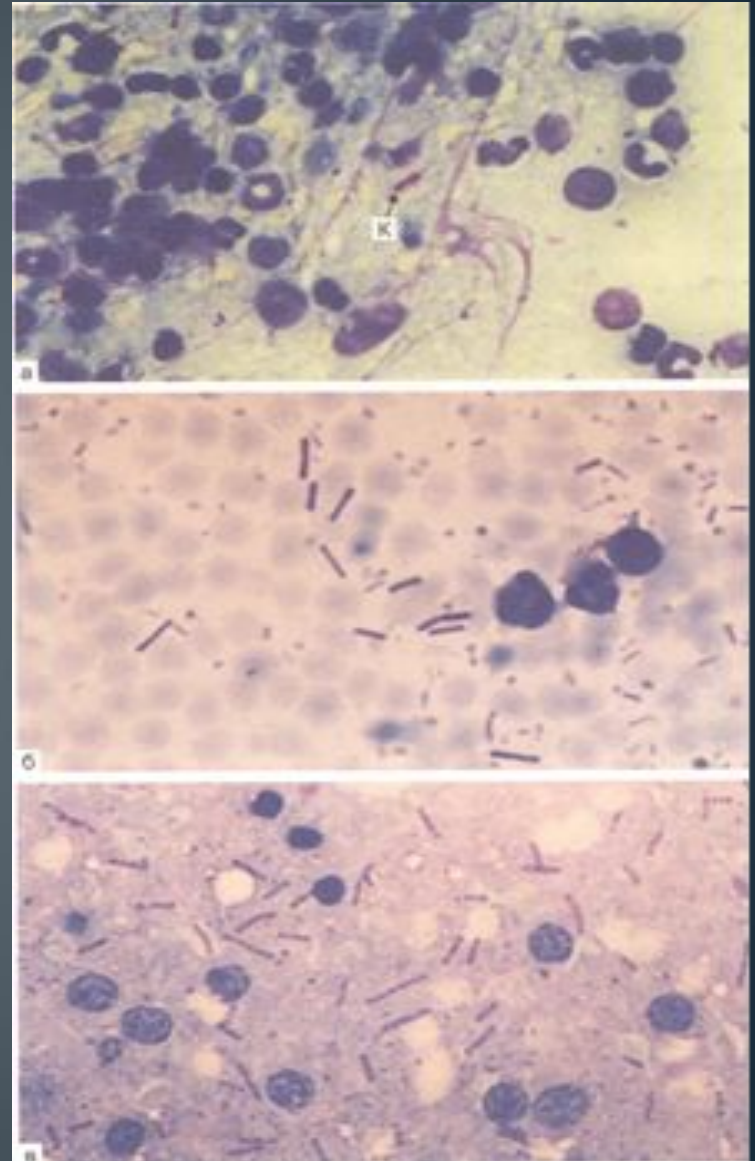


**Рис. Клетки *B. anthracis* в мазках-отпечатках селезенки белой мыши, павшей от сибирской язвы.**

Окраска по Романовскому-Гимзе. х 1150.

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

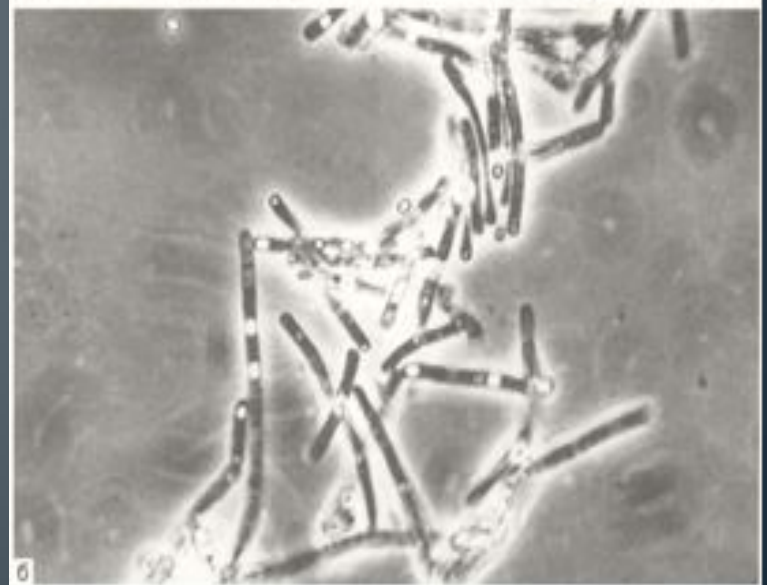
**б, в** - исчезновение капсулы при хранении трупного материала или разрушении в процессе приготовления препарата.



**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

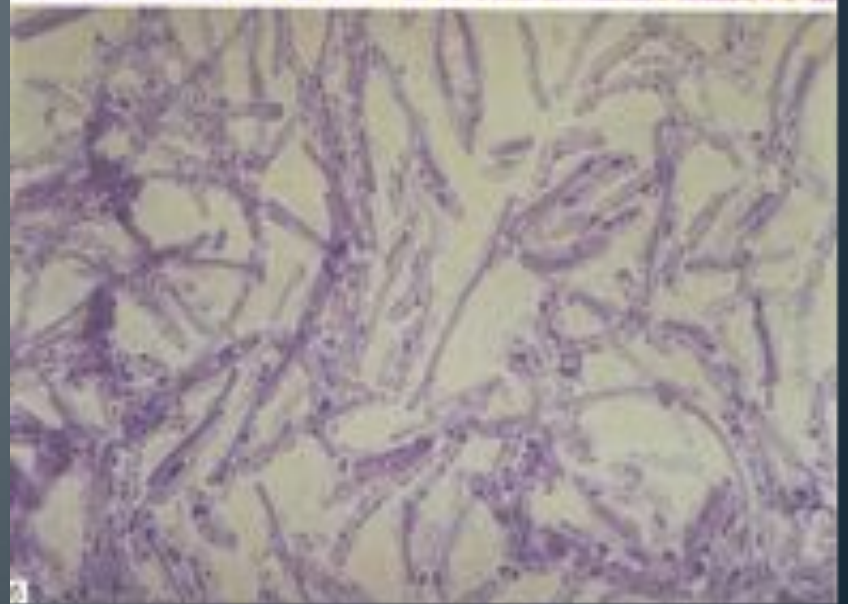




**Рис.** Капсула клеток *B. anthracis* в окрашенных мазках культур, выращенных на бикарбонатном агаре в атмосфере углекислого газа в течение 48 ч. Штамм 14/41. x1150.

**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**

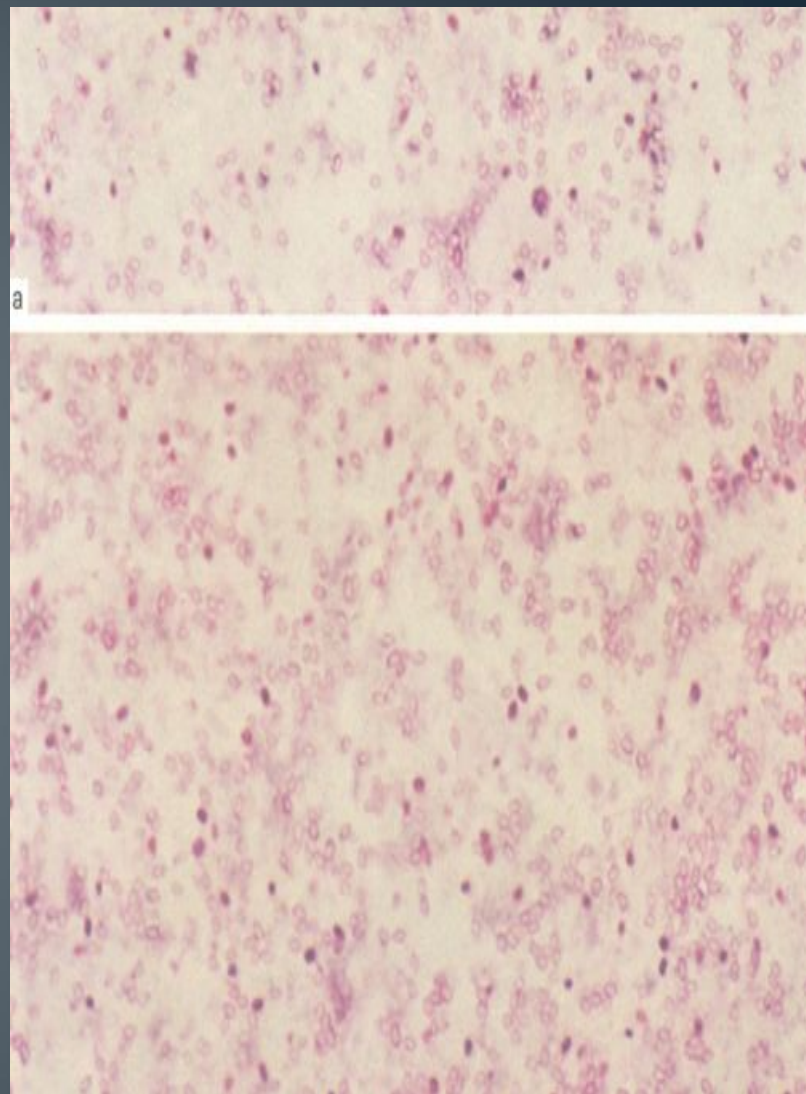


**Рис. Микроскопическая картина спор *B. anthracis* в окрашенных мазках культур, выращенных на агаре Хоттингера в течение 72 ч.**

**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*.**

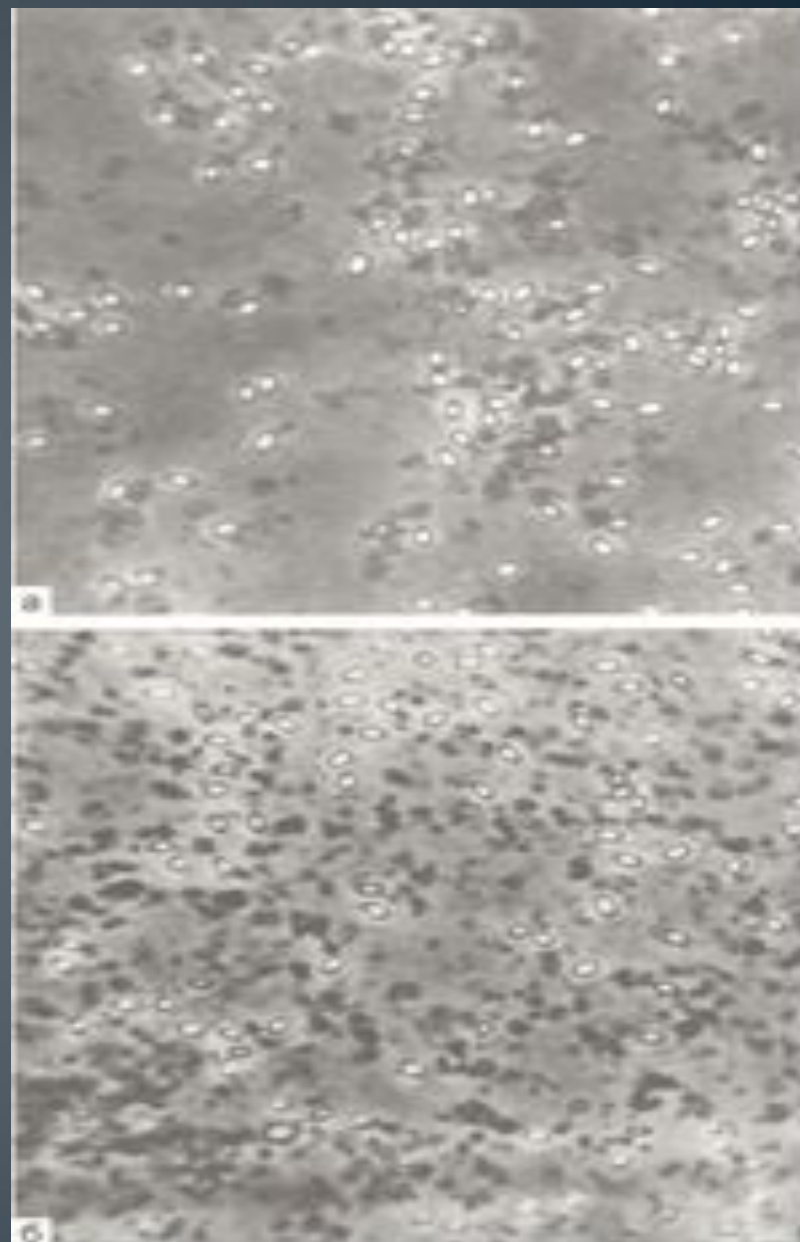
Иммобилизация спор  
агаровым гелем. Фазовый  
контраст.

1350.

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

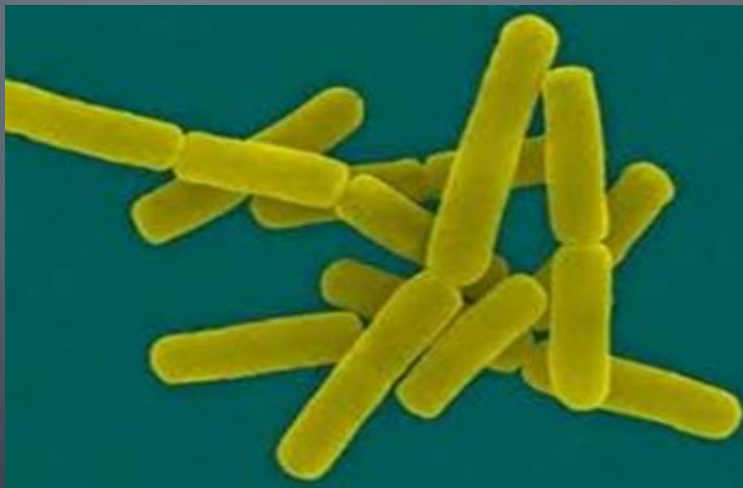
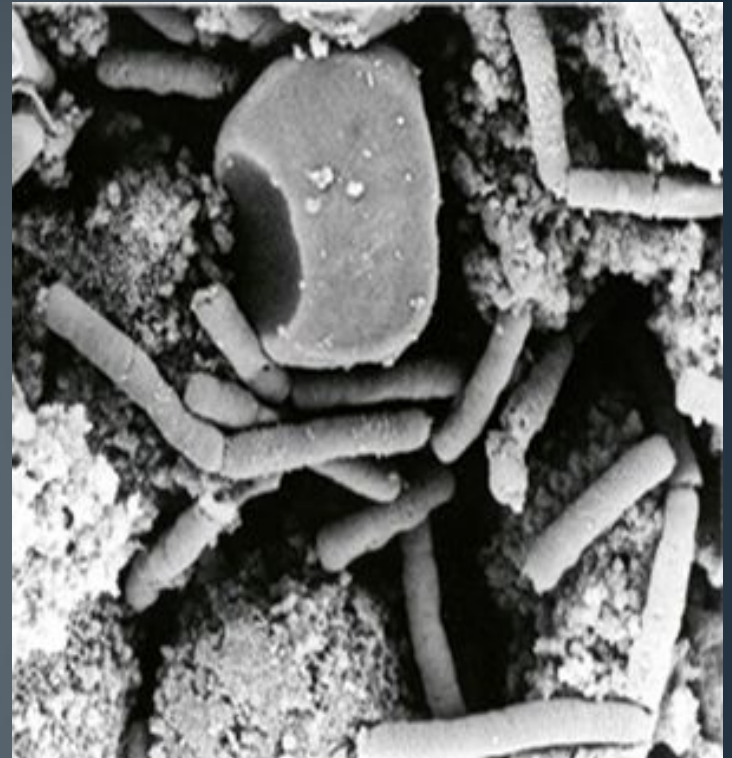
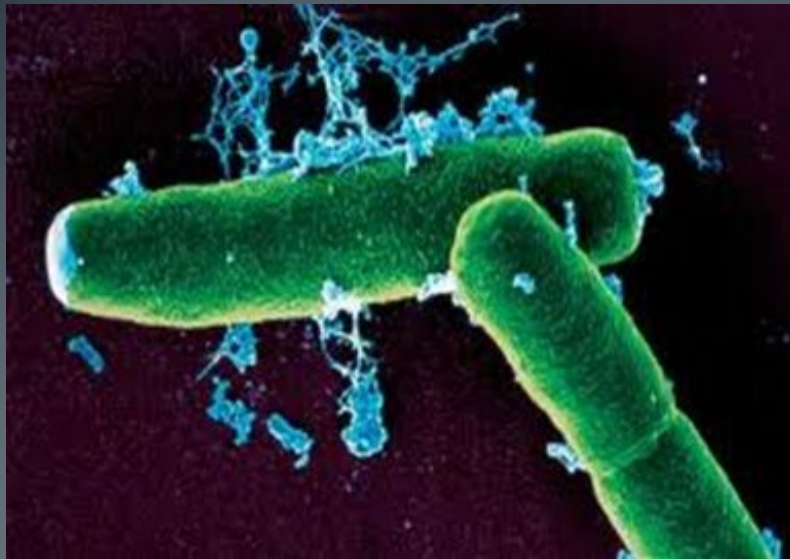
**Деструктивно изменен  
ные споры, а также  
споры в стадии  
прорастания округлые и  
диффузно потемневшие**

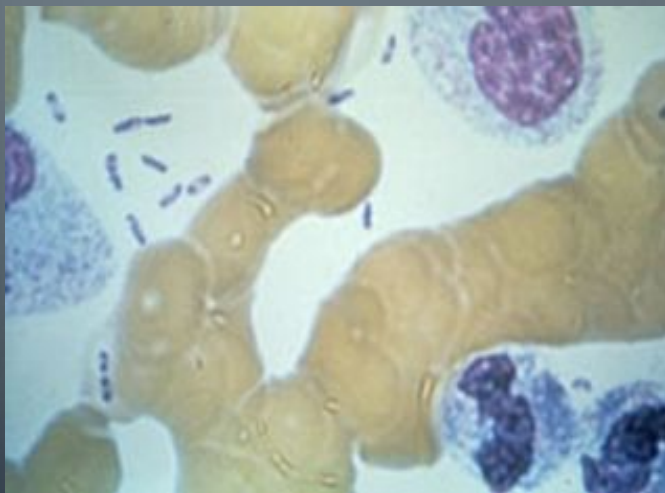
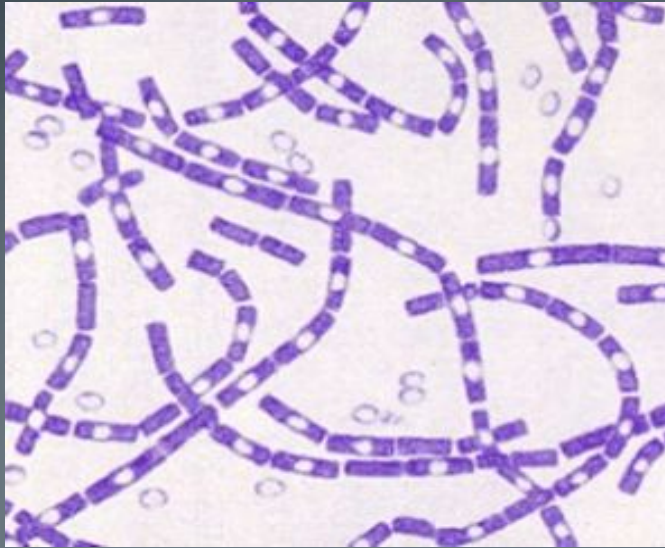
**(б)**



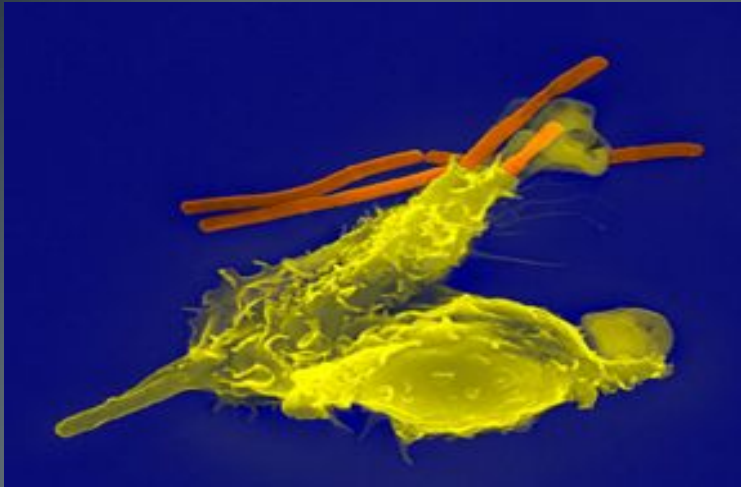


Споры возбудителя сибирской язвы чрезвычайно устойчивы к физическим и химическим воздействиям и сохраняют жизнеспособность в течение многих лет (клетка со спорами выделена розовым цветом). Фото © Dennis Kunkel Microscopy, Inc./Dennis Kunkel





**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.



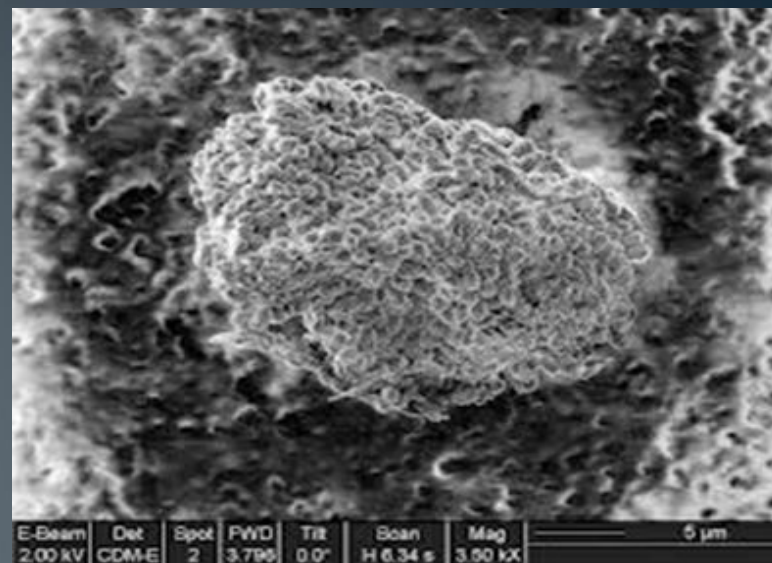
Нейтрофил, поглощающий возбудителя сибирской язвы. После разрушения клеточной стенки бактерии компоненты её цитоплазмы спровоцируют дальнейшее развитие иммунного ответа. (Фото [Science Photo Library](#).)



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







**Возбудитель сибирской язвы  
*Bacillus anthracis*, иллюстрация с  
сайта [freewebs.com](http://freewebs.com)**

**Микрофотографии сибирской  
язвы**



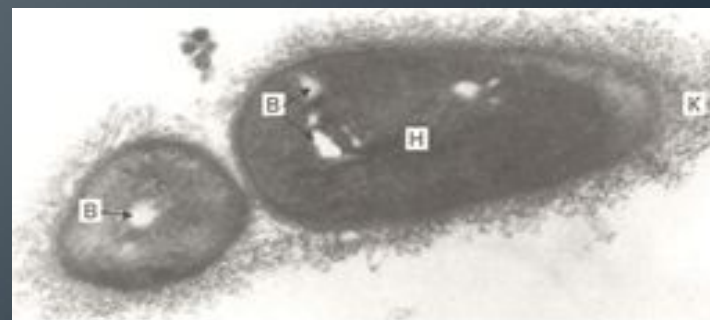
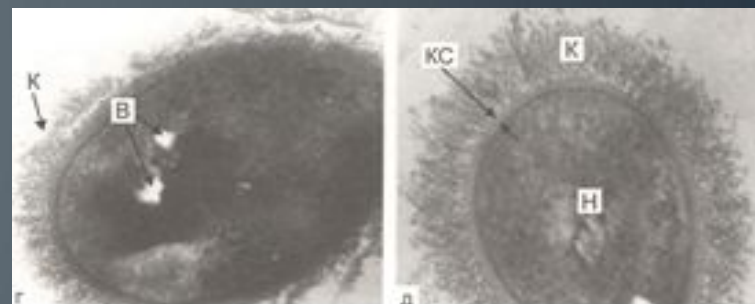
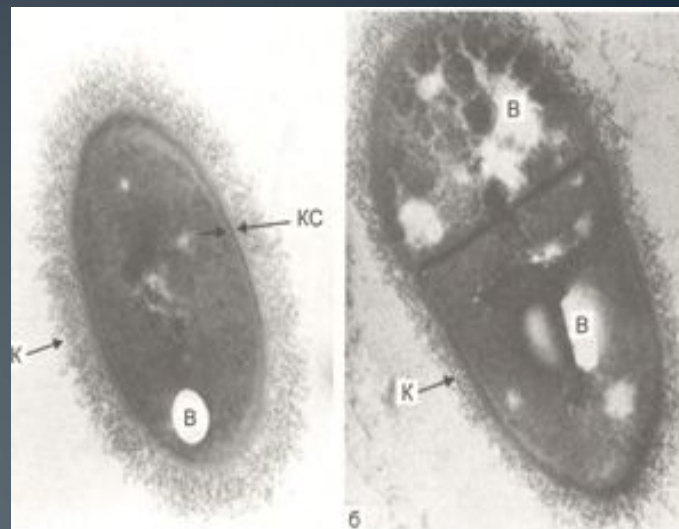
**Рис. Ультраструктура капсулы клеток *B. anthracis* выращенных на бикарбонатном агаре в атмосфере углекислого газа в течении 48 ч.**

**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.**



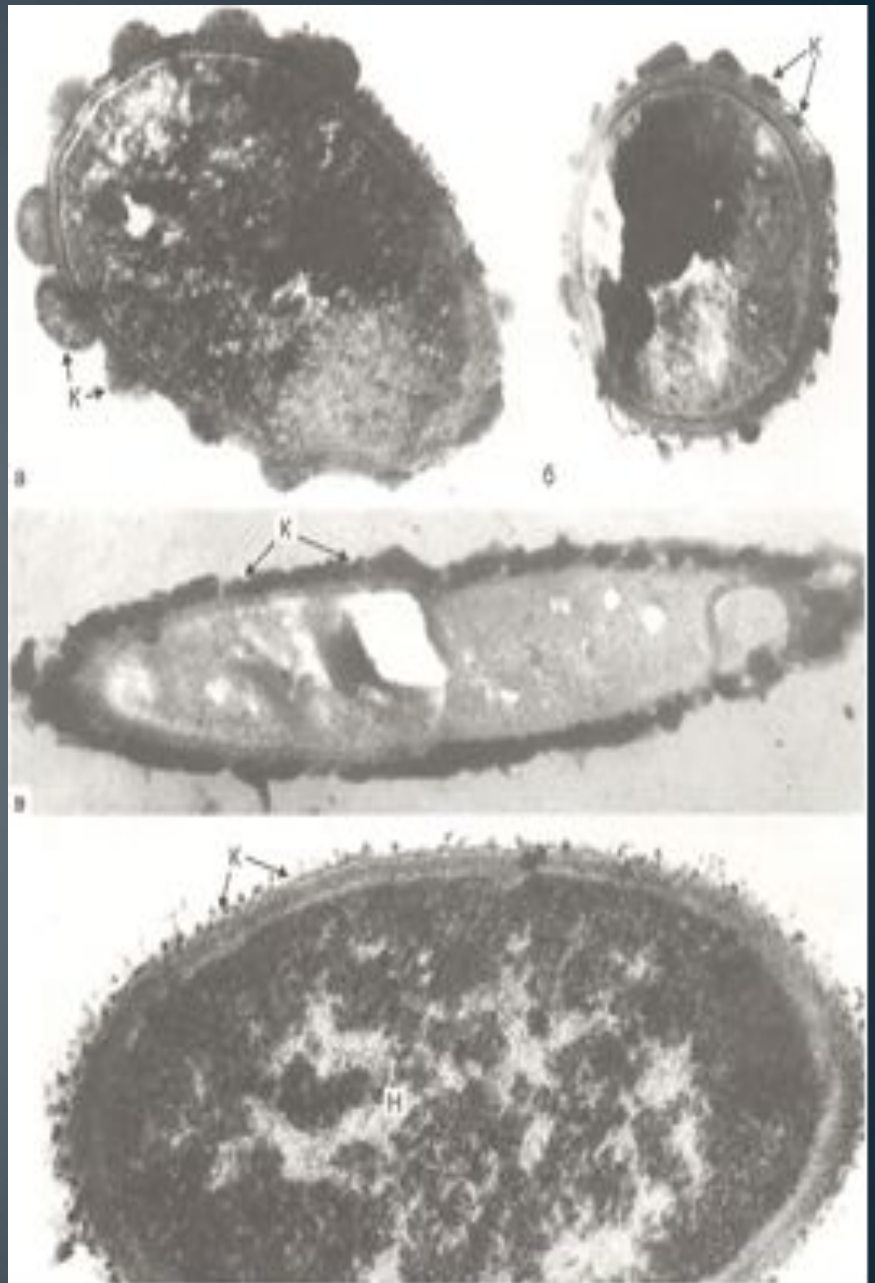
**Рис. Цитохимические реакции с компонентами капсулы *B. anthracis*.**

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.

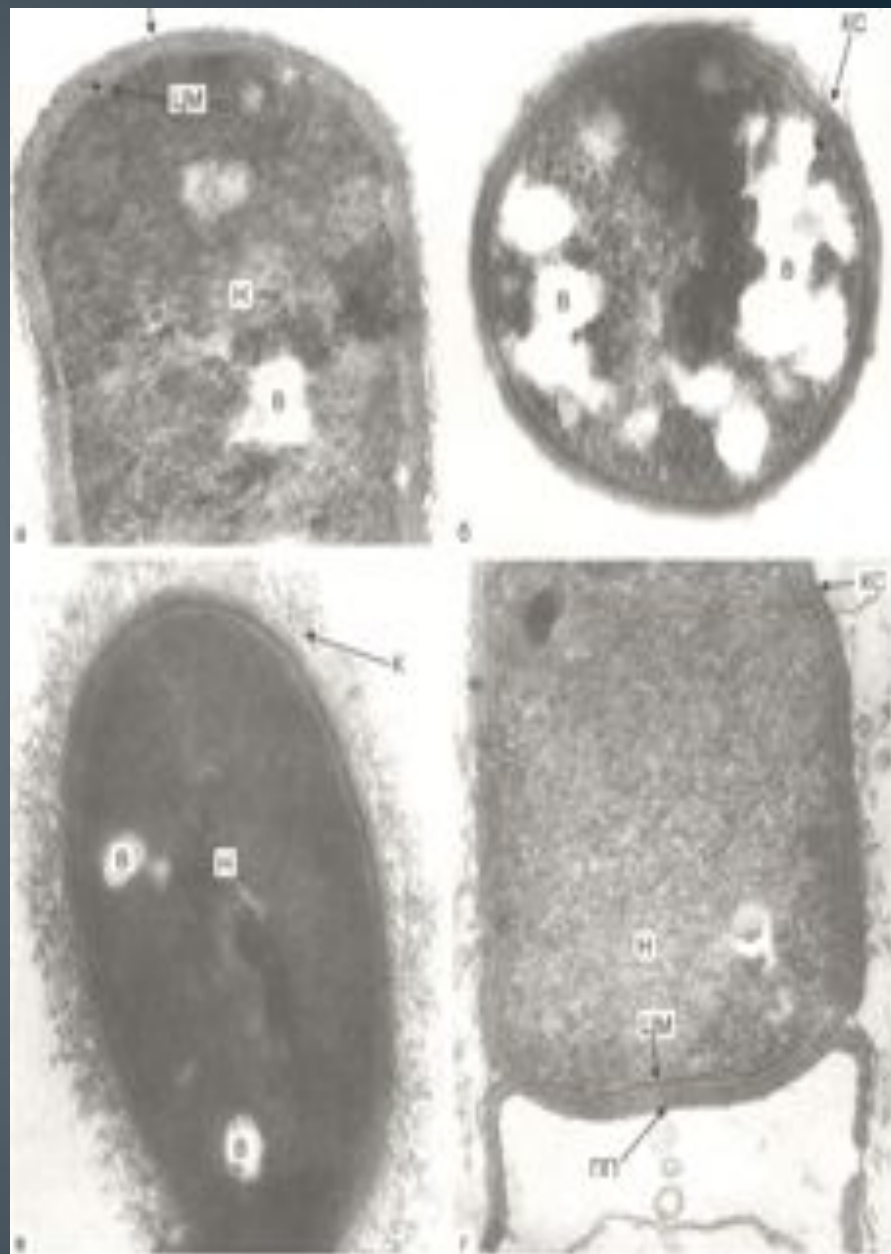


**Рис. Варианты тонкого строения** клеток *B. anthracis*, выращенных на агаре Хоттингера в течение 24 ч. Штамм Ч-7. х60 000 (а, б, г); х40 000 (в). Видны гомогенное (а, г) и двухслойное строение клеточной стенки (б, в).

**У бескапсульных клеток с поверхности клеточной стенки происходит сдувание 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*.**

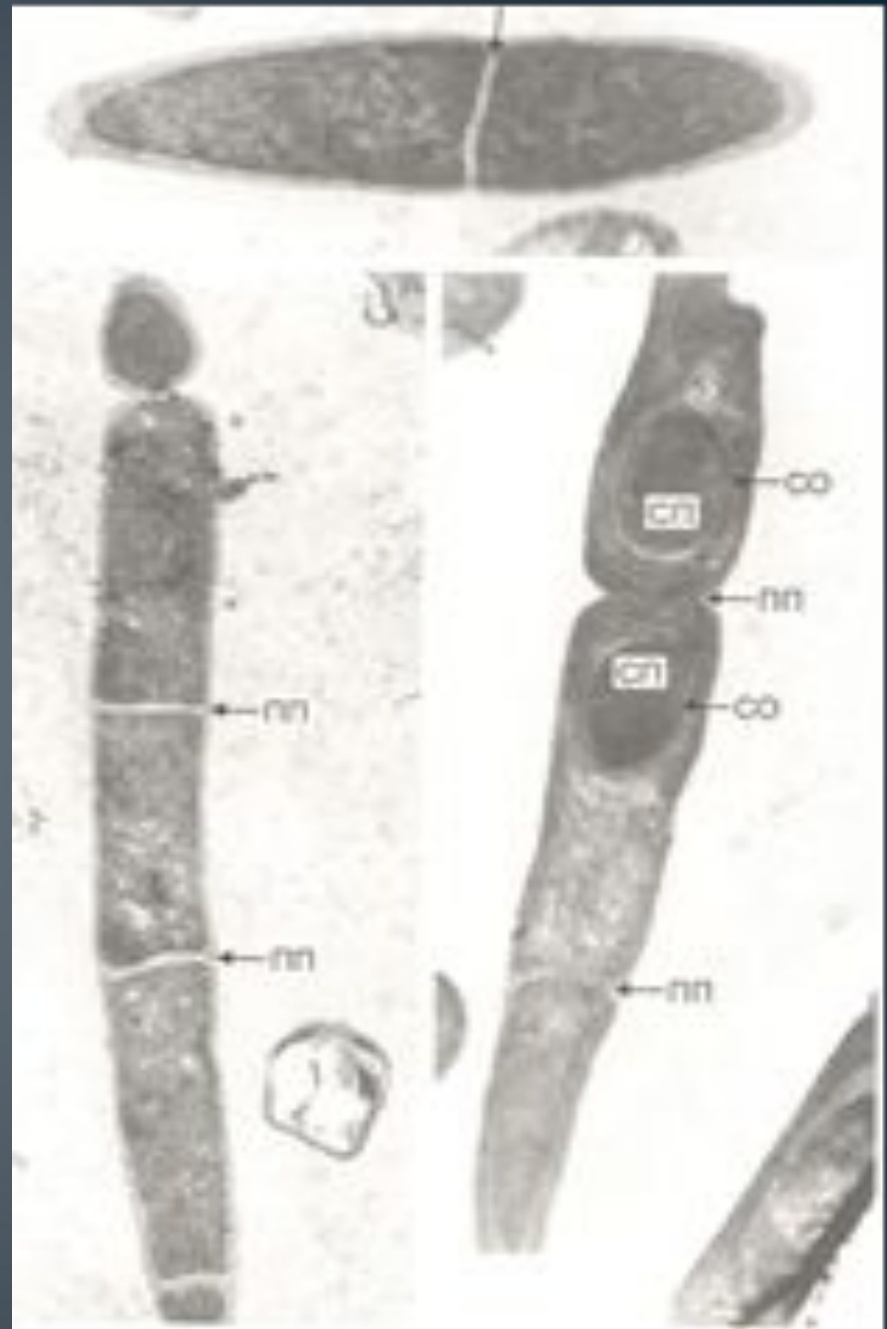
Штамм Ч-7. хю 000 (а, б); х30  
000 (в).

- 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*.**

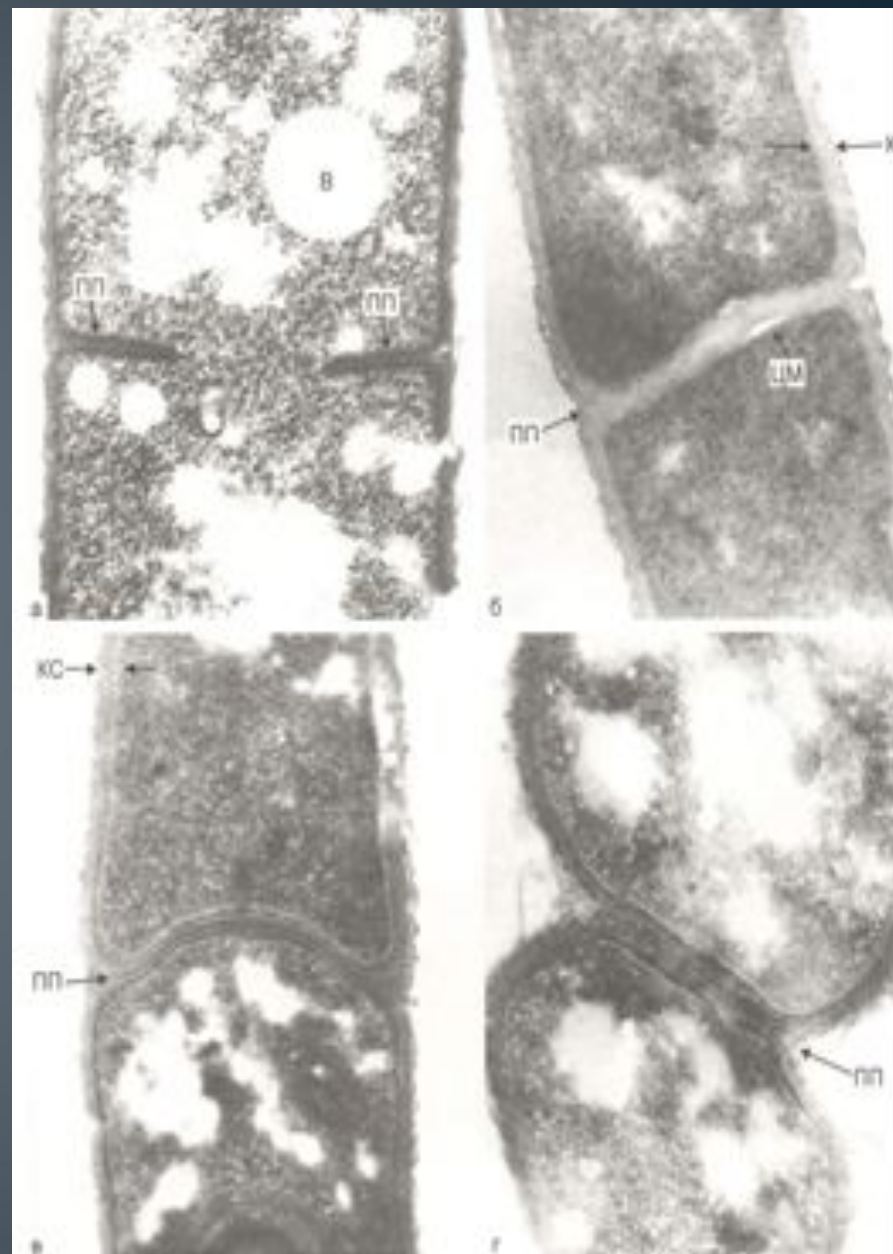
**Условия выращивания - см. рис. 2.10. Штамм Ч-7. х60 000 (а, г); х40 000 (б, в).**

**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.**

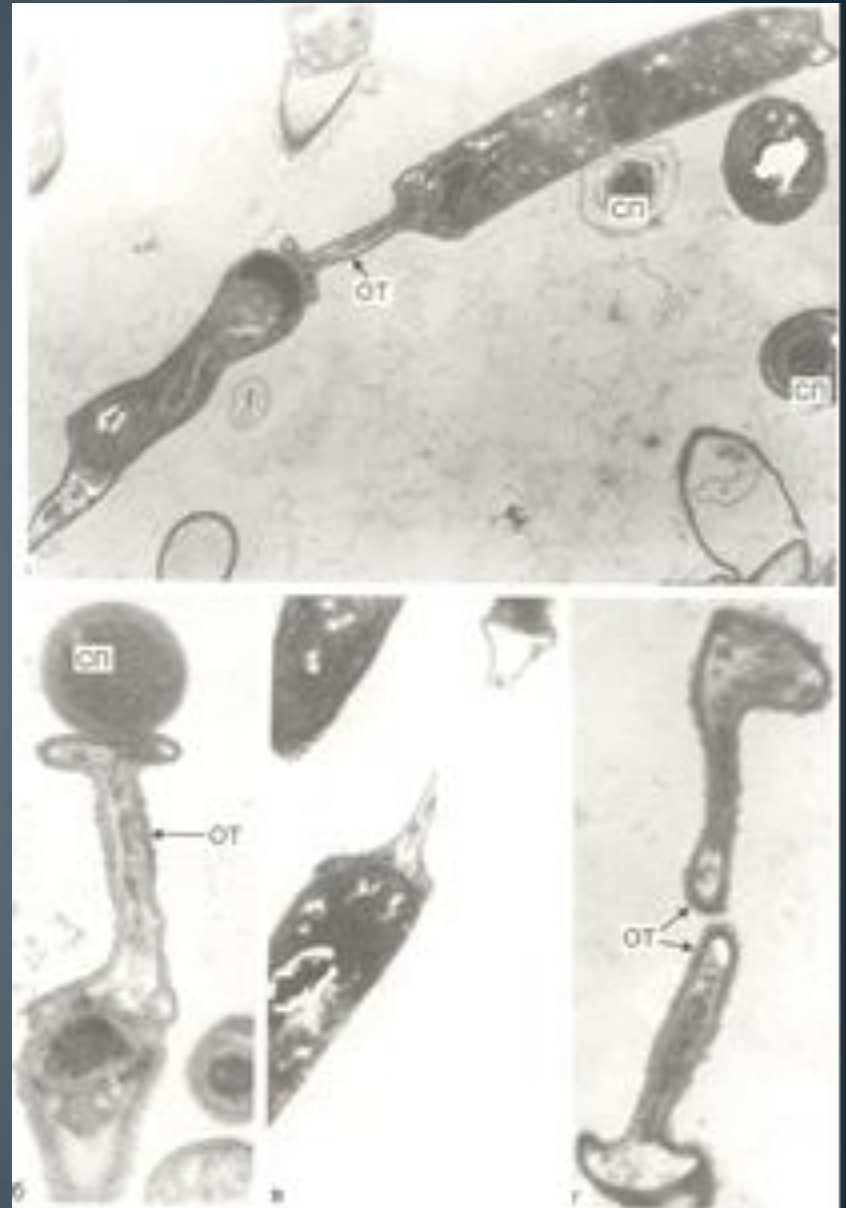
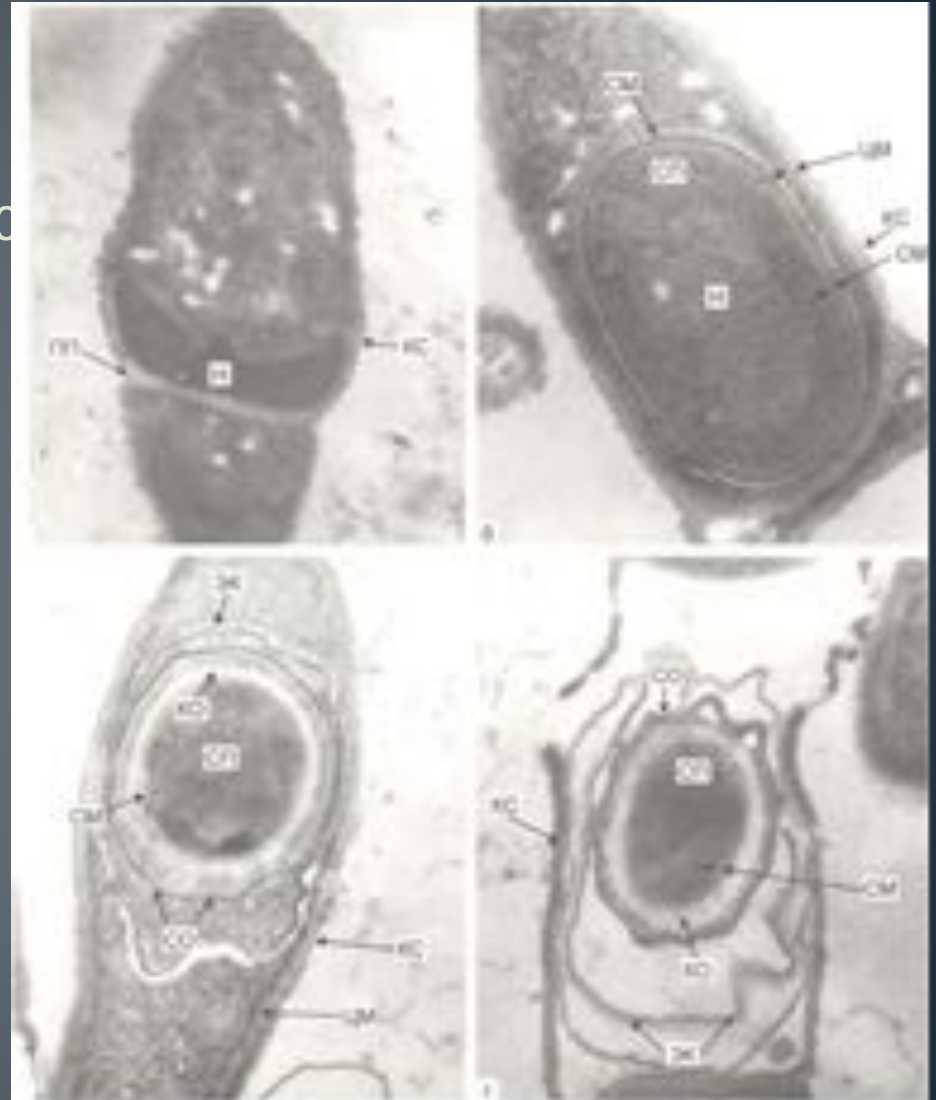




Рис. **Спорообразование у *B. anthracis*, выращенных на агаре Хоттингера в течение 72 ч. Штамм 14/41. хзо 000 (а, б); х20 000 (в, г).**

**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,**

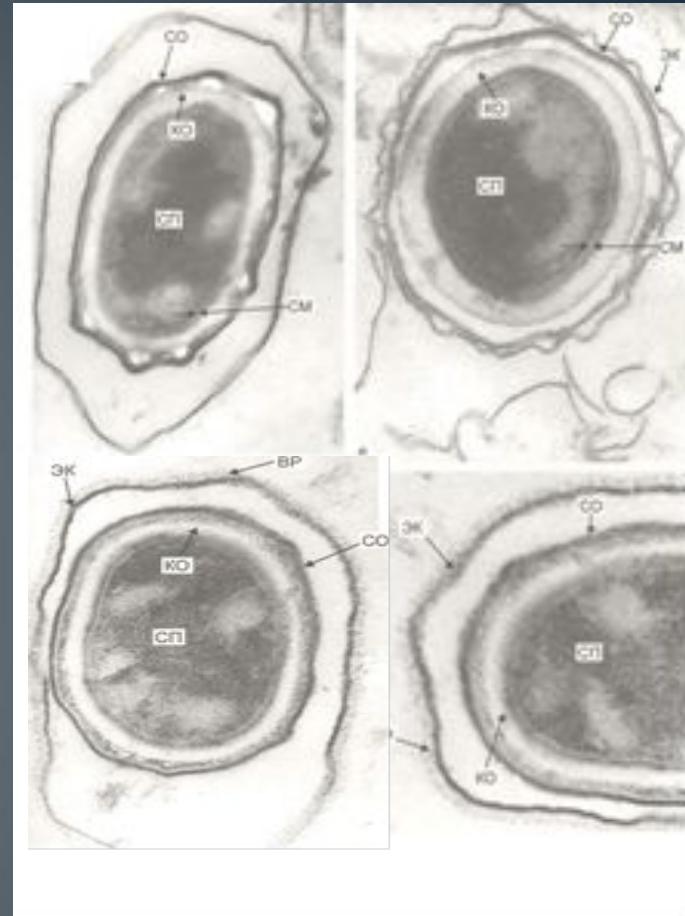
**клеточная стенка,**

**кортекс,**

**споровая оболочка и экзоспориум.**

На наружной поверхности

экзоспориума имеется **спой**

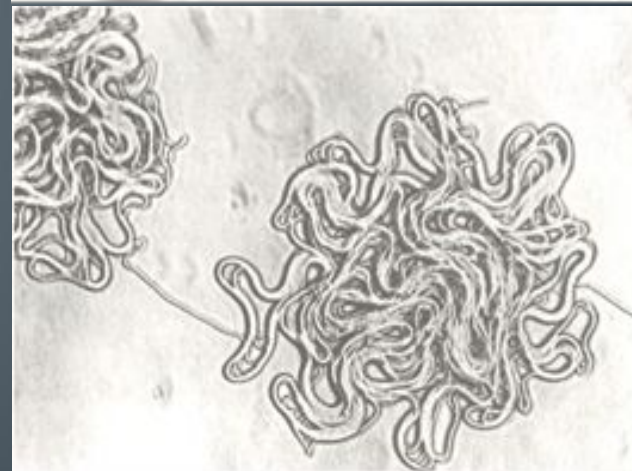


**Рис.** Микроколонии сибиреязвенных микробов, выращенных в течение 9 ч на агаре Хоттингера.

**Микроколонии образованы нитевидными клетками, завитыми в несколько слоев.** Фазовый контраст. х56.

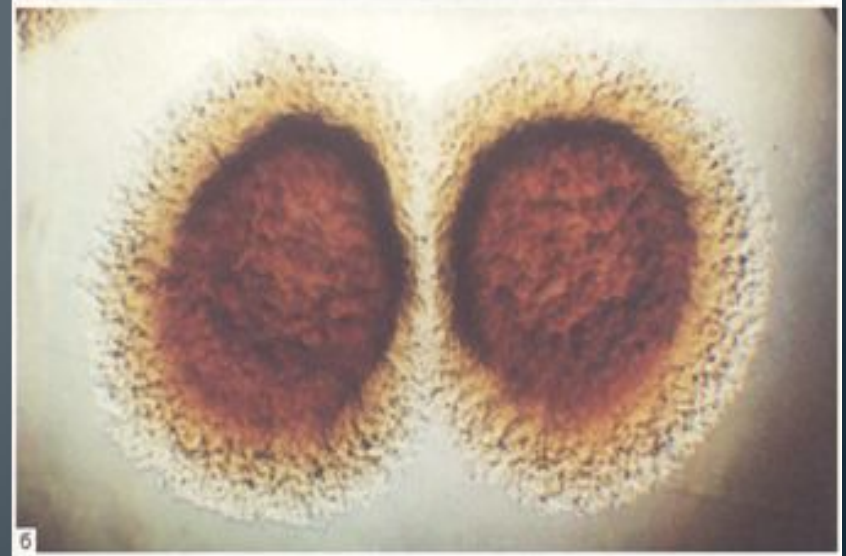
**а** - штамм СТИ-1;

**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**

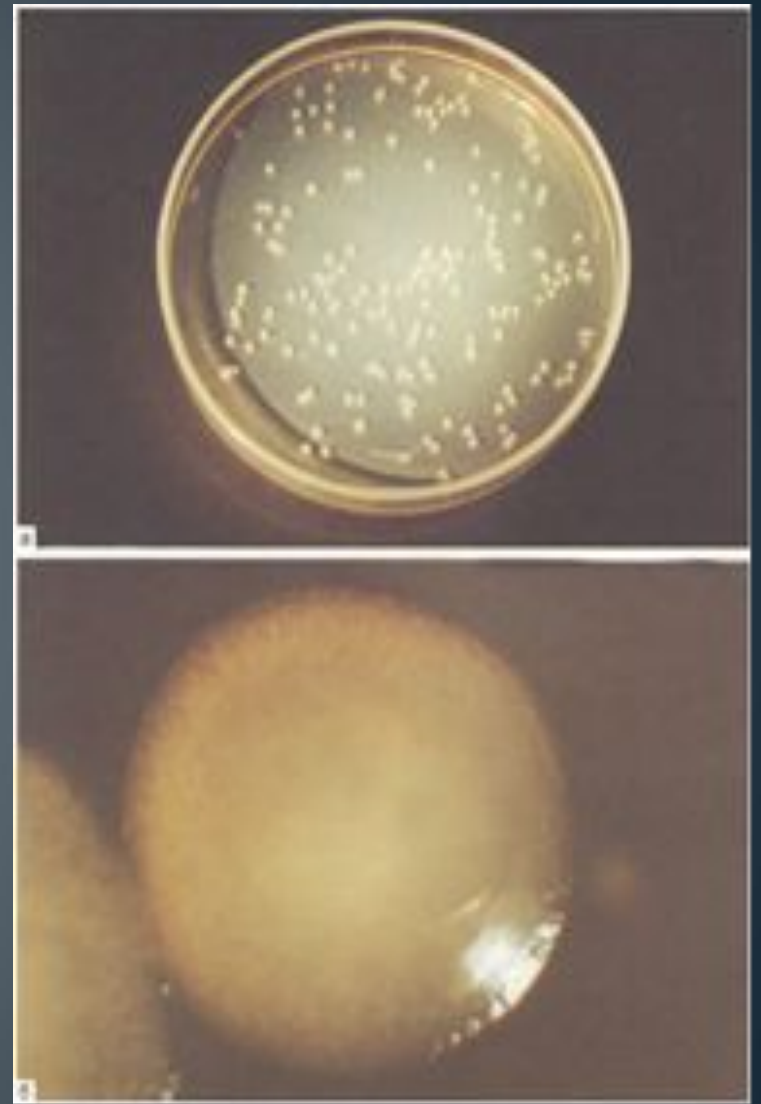


**Рис. Морфологические особенности колоний капсульных бактерий возбудителя сибирской язвы.**

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:

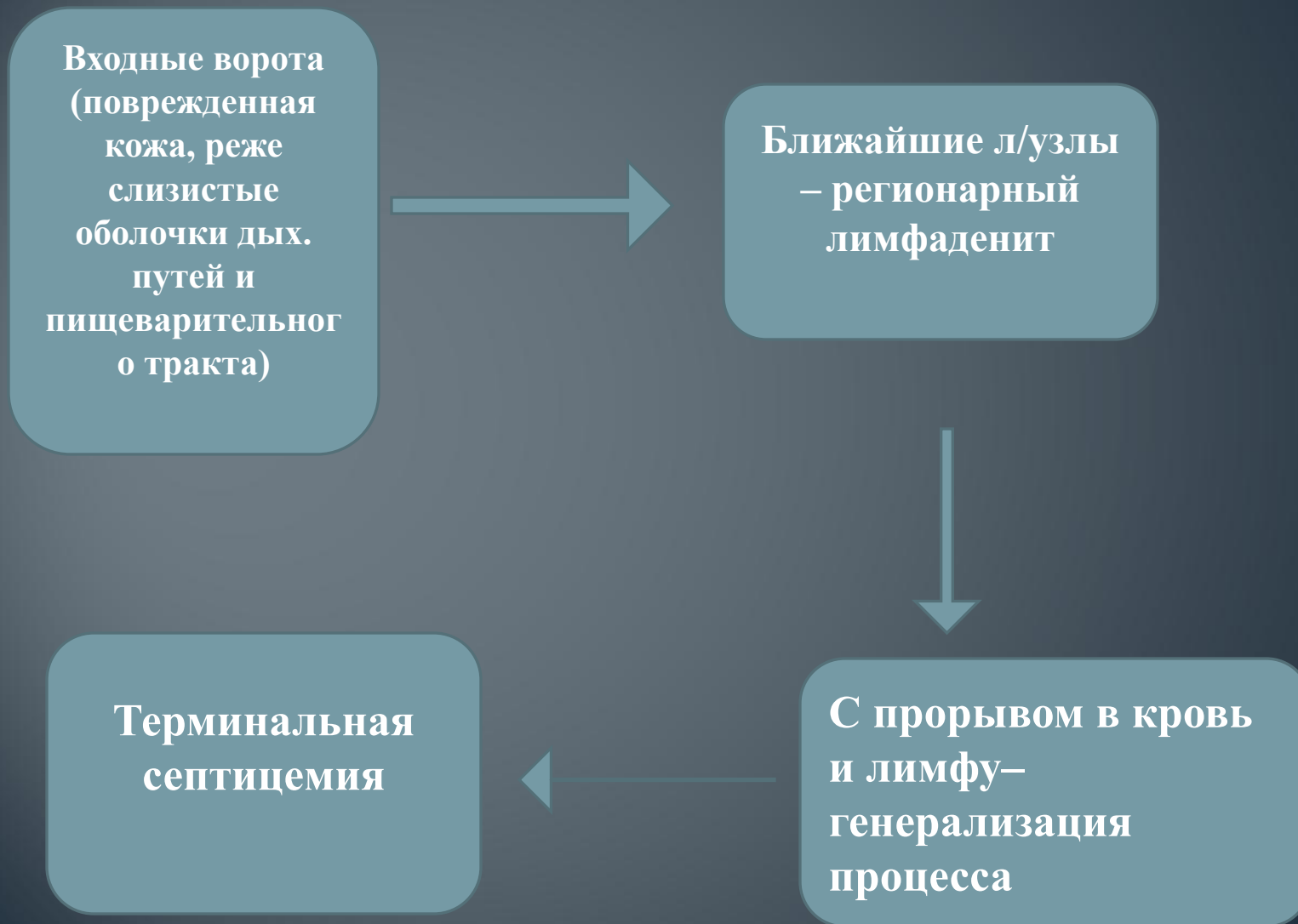
-КОНТАКТНЫЙ

-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

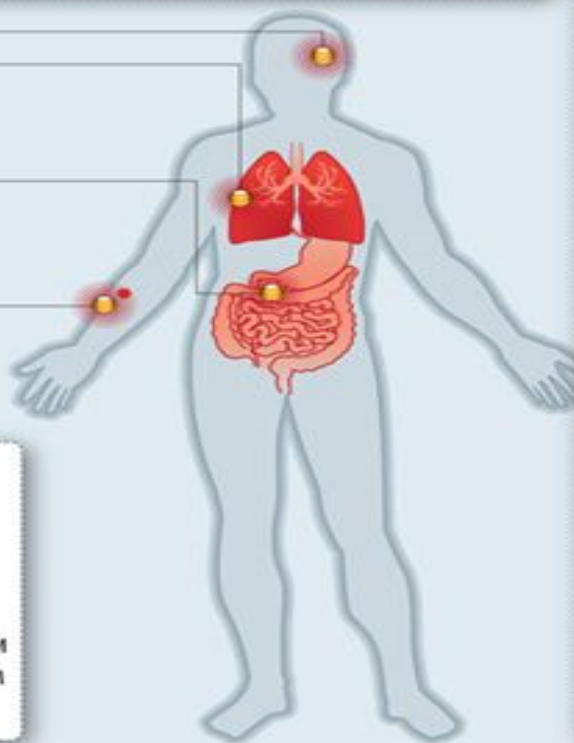


летальность – около 50%

## 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)

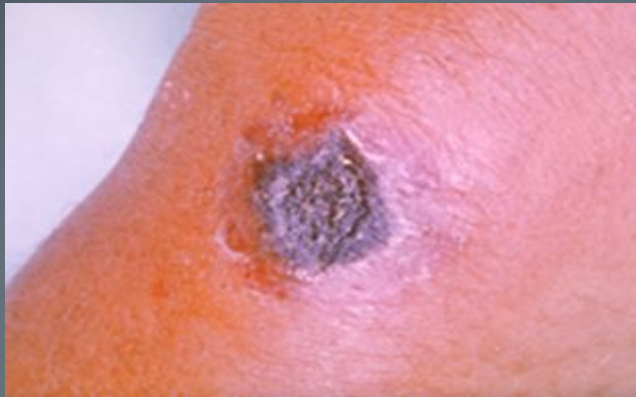
Клинические формы  
сибирской язвы у  
человека в  
зависимости от места  
внедрения  
возбудителя:

- 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
<b>Содержимое везикул, карбункула, отторгнутый струп</b>	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
<b>Мокрота</b>	Собирают в стерильные широкогорлые банки
<b>Испражнения</b>	Тоже
<b>Кровь</b>	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
<b>Почва</b>	Предварительно снимают верхний слой почвы (2-3 см). Пробы берут почвенным буром на глубине до 15 см, на территории скотомогильников - до 2 м
<b>Вода</b>	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
<b>Смывы</b>	Берут с площади 100 см <sup>2</sup> тампоном, смоченным стерильной водой, который затем помещают в пробирку с 1-5 мл стерильной воды
<b>Шерсть</b>	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
<b>Кожа (шкурки)</b>	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
<b>Корма</b>	<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 м<sup>2</sup> 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 м<sup>2</sup> площади скирды. Так же отбирают зеленую массу.</p> <p><i>Корнеплоды</i> отбирают из расчета 1-3 штуки на 4 м<sup>2</sup> 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
<b>Трупный материал</b>	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 -
<b>Почва</b>	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
<b>Корма</b>	Готовят аналогично
<b>Вода</b>	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
<b>Смывы</b>	Тампоны отжимают о стенки пробирки и удаляют, оставшуюся жидкость подвергают исследованию
<b>Шерсть</b>	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
<b>Кожа (шкурки)</b>	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 сибирезвенно 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** (рН 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 анаэроустате при содержании 10-50 % CO<sub>2</sub> 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 сибирезвечного 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**.

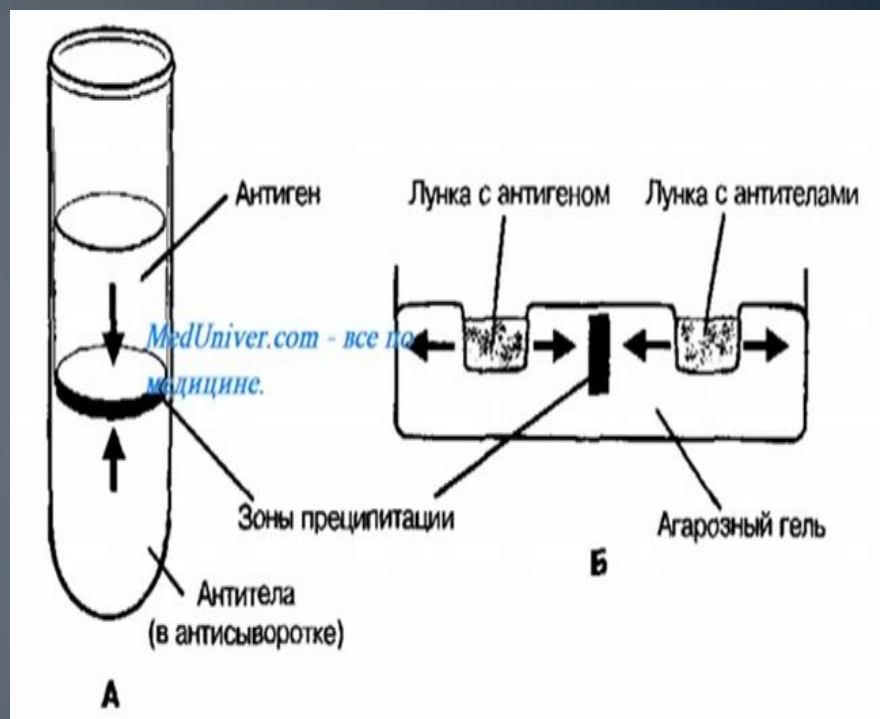
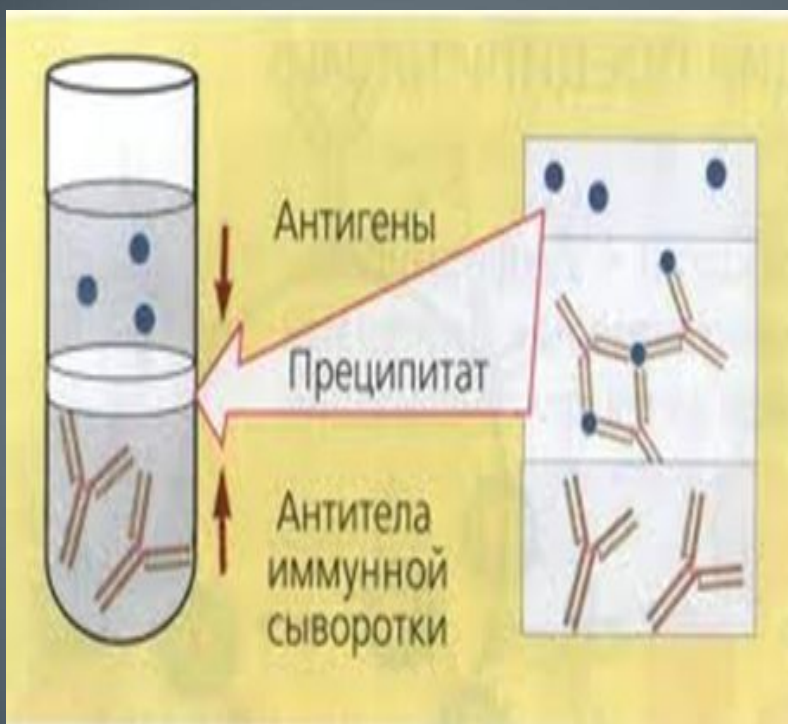
**Фильтрат** наслаивают на преципилирующую

**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

Fur

Bioterror

Goat

Spore

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!!!**