


БИОХИМИЯ ЧУМНОГО МИКРОБА

A laboratory setting with a test tube containing a red liquid and a pipette above it. The background is a light blue gradient with a grid of small circles. The text is overlaid on the image.

С.Н.С, К.М.Н.
БОРЗДОВА И.Ю.

2020

КЛАССИФИКАЦИЯ ЧУМЫ по R. Devignat

БИОВАРЫ *Yersinia pestis*

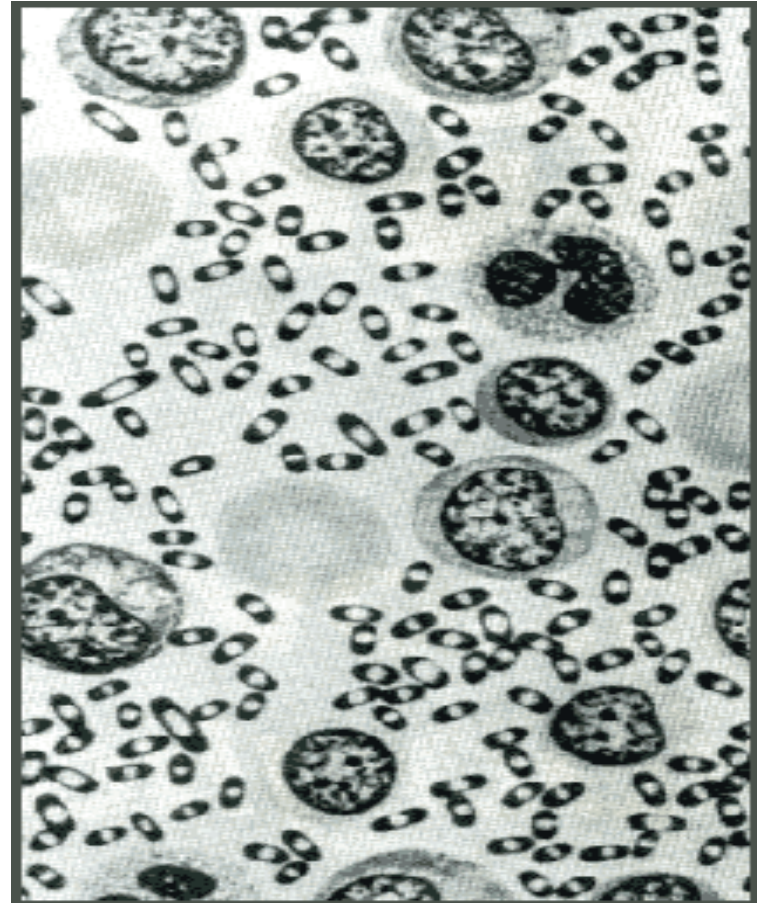
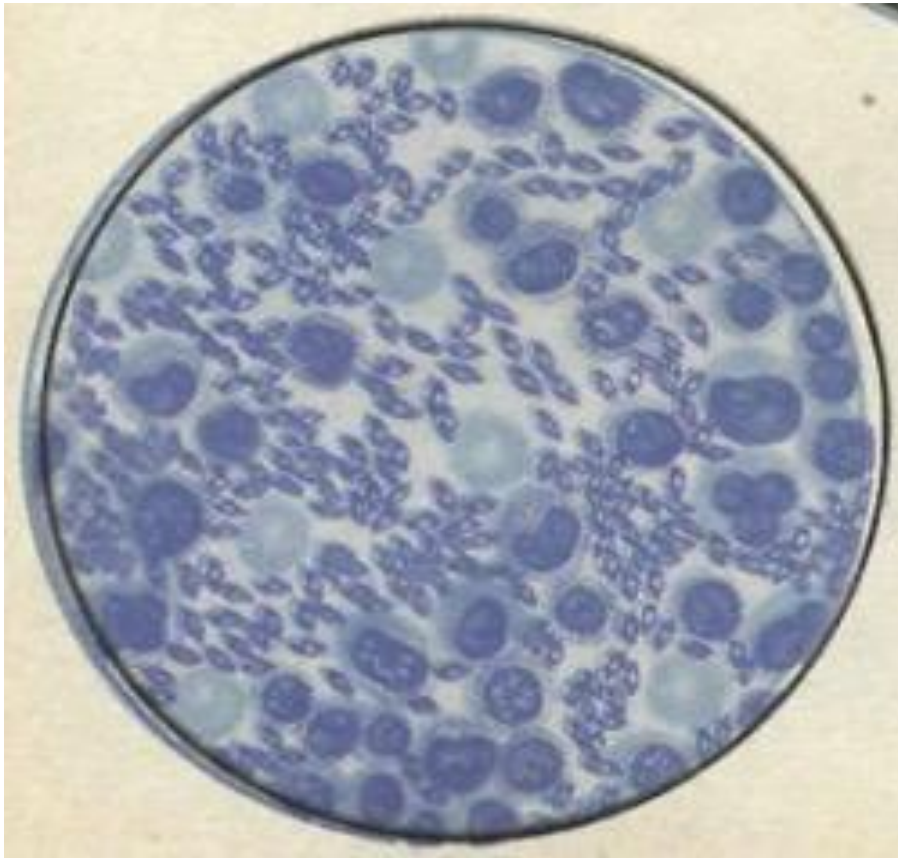
1. Antiqua (древняя)
2. Medievalis (средневековая)
3. Orientalis (восточная)

Различаются по способности ферментировать глицерин, денитрифицирующей активности, по молекулярно-генетическим свойствам

**Схема внутривидовой дифференциации
чумного микроба
(принята на Всесоюзном совещании по
таксономии чумного микроба (Саратов, 1985))**

- 1. *Y. pestis* ssp. *pestis* (основной, 3 биовара)**
- 2. *Y. pestis* ssp. *caucasica* (кавказский)**
- 3. *Y. pestis* ssp. *altaica* (алтайский)**
- 4. *Y. pestis* ssp. *hissarica* (гиссарский)**
- 5. *Y. pestis* ssp. *ulegeica* (улэгейский)**

БИПОЛЯРНОЕ ОКРАШИВАНИЕ КЛЕТОК *Y. PESTIS*



КАПСУЛА *Y. pestis*



продолжение

лактоза	-	-
САХАРОЗА	-	-
ТРЕГАЛОЗА	+/-	+
МЕЛЛИБИОЗА	+/-	+
ЦЕЛЛОБИОЗА	-	-
ЛАКТОЗА	-	-
Трисахариды		
РАФИНОЗА	-	-/+
МЕЛИЦИТОЗА	-/+	-
Полисахариды:		
ДЕКСТРИН	-/+	-/+
ГЛИКОГЕН	+	+
ИНУЛИН	-/+	-/+
СПИРТЫ:		
ЭТАНОЛ	-	-
ЭТИЛЕНГЛИКОЛЬ	-	-
ГЛИЦЕРИН	+/-	+
ЭРИТРИТ	-	-/+
АДОНИТ	-/+	-
МАННИТ	+	+
ДУЛЬЦИТ	-	-/+

ФЕРМЕНТАЦИЯ УГЛЕВОДОВ И СПИРТОВ ЧУМНЫМ И ПСЕВДОТУБЕРКУЛЕЗНЫМ МИКРОБАМИ

СУБСТРАТ	Y.PESTIS	Y.pseudotuberculosis
Моносахариды (пептозы):		
АРАБИНОЗА	+/-	+
РАМНОЗА	+/-	+
КСИЛОЗА	+/-	+
Моносахариды (гектозы):		
ГЛЮКОЗА	+	+
ГАЛАКТОЗА	+	+
ДЕКСТРОЗА	+	+
МАННОЗА	+	+
ФРУКТОЗА (левулеза)	+	+
ФРУКТОЗА	-	-
СОРБОЗА	+/-	+
Дисахариды:		
МАЛЬТОЗА	+	+

СОДЕРЖАНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ КЛЕТОК ШТАММА ЕВ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ЕГО НА РАЗНЫХ СРЕДАХ

КОМПОНЕНТЫ КЛЕТОК %	АГАР МАРТЕНА %	АГАР ХОТТИНГЕРА %	БУЛЬОН ИЗ КИСЛОТНОГО ГИДРОЛИЗАТА КАЗЕИНА %
АЗОТ	11,28	12,44-13,84	12,0-13,5
БЕЛКИ	-	76,61	56,0
ФОСФОР	1,13	1,36-1,54	-
НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ	-	8,18-14,83	-
РНК	-	5,35-12,90	11,5-13,5
ДНК	-	1,88-3,30	3,9-4,3
ПОЛИСАХАРИДЫ	5,31	2,31-3,54	7,4-9,8
ЛИПИДЫ	-	3,1-3,8	-
СВОБОДНЫЕ	6,75	1,26-2,0	-
СВЯЗАННЫЕ	-	1,8-1,82	-
ФОСФОР ЛИПИДОВ	-	-	0,5-0,7

продолжение

ИНОЗИТ	-	-
СОРБИТ	-	-
ИНУЛИН	-	-
ГЛЮКОЗИДЫ		
САЛИЦИН	+/-	+
АМИГДАЛИН	-	-
ЭСКУЛИН	+	-

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ЧУМНОГО МИКРОБА

Аспарагиновая к-та

Глутаминовая к-та

Аргинин

Лизин

Серин

Треонин

Глицин

Аланин

ВАЛИН

ЛЕЙЦИН

ПРОЛИН

ЦИСТИН

ФЕНИЛАЛАНИН

ТРИПТОФАН

МЕТИОНИН

ГИСТИДИН

НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

- В клетках *Y.pestis* суммарное содержание нуклеиновых кислот уменьшается в процессе старения культуры. Изменение суммарного содержания нуклеиновых кислот происходит в основном за счет РНК. Что касается ДНК, то, как правило, колебание количества ее наблюдается лишь в более ранние сроки выращивания *Y.pestis*. Однако иногда это происходит в поздних фазах роста.
- Количество ДНК на одну микробную клетку *Y.pestis* (логарифмическая фаза развития) в популяции, выращенной на бульоне Хоттингера в стационарных условиях, составляет $0,827 \cdot 10^{-14}$ г.
- Уменьшение содержания нуклеиновых кислот, опять таки за счет РНК, отмечено также в процессе роста *Y.pestis* при 37°C , который обычно хуже, чем при 28°C , и сопровождается повышением питательных потребностей клеток. Температура 37°C , является менее благоприятной и в отношении накопления растворимых полифосфорных соединений в клетке *Y.pestis*.
- РНК является наиболее чувствительным элементом клетки, почти мгновенно реагирующим на изменения окружающих условий. Биологическая сущность этого явления понятна, так как с содержанием РНК связана скорость белкового синтеза.

ЛИПИДЫ

Количество липидов в клетке составляет 3,7%.

Физико-химические свойства этих компонентов *Y.pestis*:

температура плавления (40°),
йодное число (27,7-29,6),
число омыления (169-188).

Количество липидов, как и некоторых других компонентов, зависит от условий культивирования *Y.pestis*. В клетках, выращенных при 37°С, по сравнению с клетками, выращенными при 28°С, увеличивается содержание липидов. Так, количество общих липидов, выраженное в процентах к сухому весу клеток, было увеличено в 1.3-3 раза, количество свободных липидов – в 2,2,9 раза, количество связанных липидов - в 0,8-3 раза.

В составе липидов *Y.pestis* выявлены моно-, ди-, триглицериды, микрозиды, свободные жирные кислоты, лецитины, кефалины, коламин, серинфосфатид, неидентифицированный фосфатид, фосфатидные кислоты, метиловые эфиры жирных кислот, стерины и стериды отсутствовали.

Среди жирных кислот свободных липидов *Y.pestis* обнаружено 8 насыщенных высших жирных кислот, 21 ненасыщенная и 2 разветвленных.

Особенностью состава липидов клеток *Y.pestis* является наличие жирных кислот с циклопропановым кольцом, а также большого количества разветвленных и полинасыщенных жирных кислот.

МОНОСАХАРИДНЫЙ СОСТАВ КЛЕТОК *Y. PESTIS*

❖ КСИЛОЗА	10
❖ ГЛЮКОЗАМИН	20
❖ ГЛЮКОЗА	10
❖ РИБОЗА	10
❖ АРАБИНОЗА	1
❖ РАМНОЗА	1
❖ МАННОЗА	1
❖ АЛЬДОГЕПТОЗА	1
❖ ГЛЮКУРОНОВАЯ КИСЛОТА	1
❖ ГАЛАКТОЗА	100

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ КЛЕТОК Y.PESTIS И ИХ ОБОЛОЧЕК (ПО Е.П.ЕФИМЦЕВОЙ)

ПРЕ- ПАРАТЫ	АЗОТА	БЕЛКА	ФОС- ФОРА	НУК- ЛЕИ- НОВЫХ КИС- ЛОТ	РЕДУЦИ РУ- ЮЩИХ ВЕЩЕСТ В	ГЕКСОЗ- АМИНА
ЦЕЛЫЕ КЛЕТКИ	9,25	58,70	1,54	6,75	7,68	-
ОБОЛО- ЧКИ	4,48	29,74	1,01	0,018	18,30	2,21

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ КЛЕТОЧНОЙ ОБОЛОЧКИ ЧУМНОГО МИКРОБА

ЛИЗИН

АРГИНИН

АСПАРАГИНОВАЯ К-ТА

ФЕНИЛАЛАНИН

ГЛИЦИН

ГЛЮТАМИНОВАЯ К-ТА

ТРЕОНИН

АЛАНИН

ТИРОЗИН

ЛЕЙЦИН

ИЗОЛЕЙЦИН

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ МЕМБРАННЫХ СТРУКТУР КЛЕТОК ЧУМЫ (СУХОГО ВЕСА)

- БЕЛКИ – 64%
- ЛИПИДЫ – 19%
- УГЛЕВОДЫ – 5,8%
- НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ – 1,8%
- Свободно экстрагируемые липиды мембран характеризуются высоким содержанием неэстерифицированных жирных кислот – 38,1%. На долю фосфолипидов в них приходится 37,3%. Основными компонентами фосфолипидов являются фосфатидилэтаноламин, изофосфатидилэтаноламин, дифосфатидилглицерин и фосфатидилхолин. В меньшем количестве присутствуют инозинфосфатиды, фосфатидные кислоты, фосфатидилглицерин и другие фракции. В составе белка мембранных образований обнаружено 10 аминокислот.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

В обычных условиях культивирования клетки *Y.pestis* обладают отрицательным зарядом. У клеток, выросших при 30°C и pH 7,0 электрофоретическая подвижность соответствует 0,91 мк/сек/В/см. При pH 6,7 и температуре около 37° С она снижается, что свидетельствует об изменении поверхностного заряда. Позже выяснилось, что это явление связано с образованием так называемого pH-6-антигена. Изоэлектрическая точка клеток возбудителя чумы лежит в интервале pH 4,0-4,4, т.е. в зоне, характерной для грамотрицательных микробов (изоэлектрические точки грамотрицательных клеток группируются около pH 5,0, а грамположительных – около pH 2).

Работы Коробковой Е.И. и др. показали, что рост *Y.pestis* в среде сопровождается восстановлением ее компонентов. На бульоне Мартена при 37° С клетки чумы в первые 4 суток роста снижают окислительно-восстановительный потенциал с 25-28 до 8-11. Этому соответствует снижение pH среды и увеличение количества живых клеток в исследуемой культуре. В дальнейшем окислительно-восстановительный потенциал продолжает держаться на низком уровне (7,6-12,0) и лишь на 45 сутки поднимается почти до значения потенциала стерильной среды.

ПИТАНИЕ

- ❖ Источником углерода и энергии для *Y.pestis* в основном служат окисляемые ею вещества.
- ❖ ГЛЮКОЗА - в присутствии кислорода *Y.pestis* усваивает 58% углерода глюкозы, а при анаэробии – 39%.
- ❖ При недостатке магния в среде и при T=37 C токсическое действие на вирулентные клетки оказывают: арабиноза, фруктоза, манноза, глюконат и др.
- ❖ МАННИТ
- ❖ РИБОЗА - источник энергии и углерода для прототрофных штаммов *Y.pestis* (ЕВ)
- ❖ РАМНОЗА
- ❖ АРАБИНОЗА
- ❖ МЕЛИБИОЗА
- ❖ КСИЛОЗА

Способность ферментировать рамнозу (Rha⁺ Rha⁻)

Рамнозопозитивные штаммы циркулируют в определенных природных очагах. Постоянно такие штаммы выделяются в *Горном Алтае, Северно-Западной Монголии, на Закавказском нагорье и на Гиссарском хребте в Таджикистане*. Кроме того, описаны случаи выделения подобных штаммов в других очагах *Монголии и Средней Азии, а также в Южной Америке и Африке*. Возникновение рамнозопозитивных штаммов связывают с экологической адаптацией чумного микроба к определенным видам млекопитающих (полевки различных видов, монгольская пищуха) и их эктопаразитов. У штаммов, выделенных в природе, способность к ферментации рамнозы коррелирует с рядом других особенностей (избирательная вирулентность для белых мышей и отдельных видов диких животных, чувствительность к пестицину I, потребность в дополнительных факторах роста, ферментация мелибиозы). Признак Rha⁺ следует рассматривать как генетическую метку штамма, свидетельствующую о его принадлежности к определенной таксономической группе.

У свежевыделенных штаммов способность (или неспособность) ферментировать рамнозу проявляется как весьма стабильный признак. Популяционный состав штаммов по данному признаку, как правило, однороден. Исключение представляют так называемые *улэгейские штаммы*, циркулирующие в Северо-Западной Монголии и Южно-Гобийском аймаке МНР. Эти штаммы при своем выделении практически не сбраживали рамнозу, если в среде Гисса только 0,5% субстрата. При 1% содержании сахара – ферментируют. При изучении клеточного состава на среде Н.Ф.Касаткина улэгейские штаммы дают образование как Rha⁺ и Rha⁻ колоний. Спонтанные Rha⁺ мутанты рамнозонегативных штаммов возникают с частотой 10^{-7} – 2.6×10^{-11} , индуцированные – с частотой 6×10^{-4} . По биологическим свойствам культуры мутантов в основном идентичны культурам исходных штаммов. Описаны случаи получения авирулентных неадсорбирующих гемин Rha⁺ мутантов. Случай получения спонтанного Rha⁻ мутанта из Rha⁺ культуры описан только один раз. Культура Rha⁻ мутанта не отличалась по свойствам от исходной культуры: обе культуры были авирулентными.

ФЕРМЕНТАЦИЯ АРАБИНОЗЫ (Ara⁺ , Ara⁻)

подавляющее большинство штаммов чумного микроба ферментируют арабинозу на 1-2 сутки роста. Отсутствует это свойство у рамнозопозитивных штаммов, выделяемых в Горном Алтае и на Гиссарском хребте. Рамнозопозитивные штаммы, циркулирующие на Закавказском нагорье и в отдельных районах МНР, ферментируют арабинозу на 1-2 сутки роста, также как рамнозонегативные штаммы из различных очагов Азии, Африки и Америки.

По клеточному составу популяции Ara⁺ и Ara⁻ свежевыделенных штаммов, как правило, однородны. Только в одном случае у Ara⁻ штамма, выделенного в Монголии, обнаружено 0,44% Ara⁺ -клеток. Индуцированные Ara⁻ -мутанты Ara⁺ штаммов получены с частотой $3,5 \cdot 10^{-5}$. Описаны случаи получения спонтанных Ara⁺ мутантов. По свойствам мутанты не отличаются от исходных штаммов.

Исследованиями В.С.Рудника и др. (1980) показано, что у арабинозонегативных штаммов отсутствует индуцибельный фермент арабинозоизомераза, но у них не нарушен синтез другого фермента, участвующего в окислении арабинозы, рибулокиназы. Способность ферментировать арабинозу рассматривается как генетическая метка при внутривидовой таксономии чумного микроба.

Среди Ara⁻ штаммов нередко встречаются культуры, ферментирующие арабинозу в поздние сроки выращивания. По данным А.И.Логачева (1979), изучившего более 700 Ara⁻ штаммов, на 8-30-е сутки роста арабинозу ферментирует 55,4% изученных культур. Характерно, что субкультуры Ara⁻ штаммов, полученные со среды Гисса после ферментации арабинозы в поздние сроки приобретали способность к сбраживанию данной пептозы на 1-2-е сутки роста.

Ферментации мелибиозы (Mel)

- Способность штаммов чумного микроба к ферментации мелибиозы (Mel) строго коррелирует с их способностью к ферментации рамнозы. Рамнозопозитивные штаммы, выделяемые в *Закавказье, Горном Алтае, на Гиссарском хребте и в МНР*, ферментируют мелибиозу. Отношение к мелибиозе рассматривается как генетическая метка при внутривидовой таксономии возбудителя чумы.

Ферментация лактозы (Lac) и мальтозы

- **Общепризнано, что штаммы чумного микроба не ферментируют лактозу (Lac), однако все они обладают ферментом β -галактозидазой, который находится в неактивном состоянии. Описаны случаи ферментации лактозы в очень поздние сроки: на 40-50-е сутки роста. В генетических экспериментах Lac⁺ признак сравнительно легко передается возбудителю чумы от кишечной палочки с помощью конъюгации.**
- **Штаммы чумного микроба ферментируют мальтозу на 1-2-е сутки роста. По данным И.Л.Мартиневского некоторые штаммы из Средней Азии не способны окислять мальтозу при выращивании их в аэробных условиях. Отдельные штаммы чумного микроба, выделяемые в Южно-Гобийском аймаке МНР, не ферментируют трегалозу.**

Способность к восстановлению нитратов в нитриты

Синонимы: реакция денитрификации, нитрозная реакция, нитрофицирующая способность

Указанные реакции использованы в качестве разграничительных тестов в классификациях Девинья, Туманского В.М., а также в других схемах подвидовой таксономии. Нитрификация – процесс окисления аммиака в нитриты, конечным продуктом которого является азотистая кислота. Она легко выявляется реактивом Грисса (малиновое окрашивание). Это энергетическая реакция, значение которой в обмене веществ у различных микроорганизмов неодинаково. Способностью к нитрификации обладают большинство штаммов чумного и псевдотуберкулезного микробов. Корреляция между способностью вызывать нитрификацию и другими свойствами чумного микроба практически не существует. Введение этого теста в схему классификации неоправданно.

Способность к восстановлению нитратов в нитриты

Для характеристики возбудителя чумы более важна его способность к восстановлению нитратов в нитриты. Реакция денитрификации связана с восстановлением азотной кислоты и образованием ряда продуктов, в число которых входит азотистая кислота, выявляемая с помощью реактива Грисса. Денитрификация – одна из окислительно-восстановительных реакций, протекающих в анаэробных условиях, она связана с работой двух ферментов – дегидразы и нитразы.

Впервые с помощью этой реакции показано, что штаммы, выделенные в Сибири, Индии, обладают денитрифицирующей способностью, в то время как у штаммов, полученных на юго-востоке России, нитрозная реакция отрицательна. Как правило, штаммы, выделенные в одном и том же очаге, дают однозначный результат в реакции денитрификации. Нитрозная реакция зарекомендовала себя как стойкая генетическая метка, используемая во всех схемах внутривидовой классификации чумного микроба. Клеточный состав отдельных штаммов по способности к денитрификации может быть неоднородным. Однако данные по этому вопросу немногочисленны. Изучение клеточного состава по способности к денитрификации до последнего времени сдерживалось отсутствием удовлетворительного метода учета этого признака.

Редуцирующая активностью по отношению к анилиновым красителям

Чумной и псевдотуберкулезный микробы обладают редуцирующей активностью по отношению к анилиновым красителям. Они способны восстанавливать тионин, метиленовый синий, янус зеленый, нейтральный красный, малахитовый зеленый и другие красители. Редуцирующая активность псевдотуберкулезного микроба существенно выше, чем чумного. По предложению Коробковой Е.И. разницу в редуцирующей активности по отношению к метиленовому синему стали использовать как тест при дифференциации чумного и псевдотуберкулезного микробов. Штаммы псевдотуберкулезного микроба более интенсивно редуцируют этот краситель, чем штаммы возбудителя чумы. Однако у обоих видов встречаются культуры с индивидуальными колебаниями в способности к редукции метиленового синего. Получены данные об обратной зависимости между редуцирующей способностью штаммов чумного микроба и их вирулентностью. Однако из-за недостаточного четкого проявления указанной закономерности редуцирующую активность не принято определять как косвенный показатель вирулентности.

Уреазная активность

Большинство штаммов чумного микроба не проявляют уреазной активности. Штаммы псевдотуберкулезного микроба, как правило, расщепляют мочевины. Ферментация мочевины рассматривается как один из ведущих тестов при дифференциации чумного и псевдотуберкулезного микробов. Традиционное определение уреазной активности этих микробов по методу Г.Н.Ленской с использованием мочевины и индикатора фенолфталеина может привести к ошибочным результатам, вследствие спонтанного изменения рН в щелочную сторону. Поэтому в настоящее время для учета уреазной активности нередко пользуются другими тестами (среды Кристенсена, Маслена или Молляре). К тестам, с помощью которых можно учесть уреазную активность, относится и цветная дифференциальная среда, предложенная Л.А.Тимофеевой и др. В состав среды входят глюкоза, лактоза, мочевина и комплексный индикатор (индикатор Андрее плюс бромтимоловый синий). Последний четко улавливает сдвиги рН как в кислую, так и в щелочную сторону. Среда засеивается по типу сред Ресселя. Она имеет темно-зеленую окраску. Через сутки роста возбудитель чумы вызывает изменение цвета столбика (до красно-желтого) и косяка (до сине-зеленого) за счет полной (в анаэробных условиях) и неполной (в аэробных условиях) ферментации глюкозы. Через сутки роста псевдотуберкулезный микроб изменяет окраску всей среды в синий цвет за счет расщепления мочевины.

□ Возбудитель чумы не продуцирует протеолитических ферментов, не расщепляет желатины, не свертывает молоко, не образует индола.

□ Вопрос об образовании сероводорода в течение долгого времени решался неоднозначно. Л.А. Тимофеева и др. показали, что при использовании сред, приготовленных из гидролизатов в глубоком расщеплении белковой молекулы (до 70%) и содержащих аминный азот в концентрации 150 мг %, все штаммы чумного и псевдотуберкулезного микробов индуцируют сероводород. Такой же результат можно получить на мясопептонном бульоне при добавлении к нему цистеина до концентрации 0,1-1%.

ГЕМОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

Все штаммы возбудителя чумы имеют гемолизины, которые связаны с липоидными компонентами микроба. Гемолитическая активность проявляется в жидких средах при аутолизе микробных клеток. Для ее выявления необходимо в пробирку с трехсуточной бульонной культурой добавить 0,1 мл дефибрированной крови и учитывать результат после суточной экспозиции при 37° С. При таком способе изучения не подтверждается существовавшее ранее мнение о наличии штаммов чумного микроба, не обладающих гемолитической активностью.

При 18-20 и 37° С чумной микроб дает отрицательную реакцию Фогес-Проскауэра, что свидетельствует о его неспособности к образованию ацетилметилкарбинола. Возбудитель чумы также не образует цитохромоксидазы, лецитиназы, рнитиндекарбоксилазы, лизиндекарбоксилазы, аргининдегидролазы, не вызывает утилизацию малоната натрия и дезаминирование фенилаланина, не усваивает углерод из цитрата натрия, не ферментирует тартрат и мукат натрия.

Уксусная кислота и глицин утилизируются чумным микробом для синтеза липидов, белков и нуклеиновых кислот.

Факт ассимиляции уксусной кислоты согласуется с данными о функционировании в клетках *Y.pestis* цикла трикарбоновых кислот, являющегося важнейшим источником энергии при окислении органических веществ. Наличие этого окислительного механизма позволяет считать, что любое из веществ, входящих в цикл, может в свою очередь служить для *Y.pestis* строительным и энергетическим материалом.

Показана способность чумного микроба превращать одни аминокислоты в другие при добавлении их в питательные среды. В частности орнитин в аргинин, аспарат в пролин, цистеин в метионин (Сучков Ю.Г., 1971; Король В.В., 1973).

ЗНАЧЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ ДЛЯ РОСТА ЧУМНОГО МИКРОБА

1. Не оказывающие влияния – глицин, аланин, глютаминовая и аспарагиновая кислоты, лизин, пролин, тирозин, триптофан, норлейцин, оксипролин;
2. Стимулирующие – серин, метионин, аргинин;
3. Существенные – гистидин, треонин;
4. Незаменимые – фенилаланин, цистин, лейцин, изолейцин, валин.

МИНИМАЛЬНОЕ СОДЕРЖАНИЕ АМИНОКИСЛОТ В СИНТЕТИЧЕСКОЙ СРЕДЕ ДЛЯ РОСТА ЧУМНОГО МИКРОБА

Культивирование *Y.pestis* на синтетических средах не сопровождается снижением ее вирулентности и иммуногенности. Показано, что среда, содержащая восемь аминокислот (фенилаланин, тирозин, цистин, метионин, серин, треонин, триптофан и пролин), может с успехом использоваться для сохранения вирулентности и иммуногенности штаммов *Y.pestis*.

Имеются данные о неодинаковой скорости поглощения отдельных аминокислот в процессе роста *Y.pestis*. Первыми из среды исчезают глютаминовая кислота и серин, затем снижается содержание треонина и пролина. С исчезновением глютаминовой кислоты в культуре уменьшается количество живых клеток.

Имеются сведения об использовании штаммами *Y.pestis* азота мочевины.

- фенилаланин
- треонин
- серин
- триптофан
- пролин
- тирозин
- цистин
- метионин

ЭССЕЦИАЛЬНЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ ДЛЯ ДИКИХ ШТАММОВ ЧУМЫ

К эссенциальным аминокислотам для диких штаммов следует относить фенилаланин, метионин, и во многих случаях цистеин, треонин, изолейцин.

Большинство штаммов *Y.pestis* при 28°C обходятся без витаминов. Исключение составляют штаммы, выделенные из полевок в Закавказском нагорье, которые при данной температуре, помимо некоторых аминокислот, нуждаются в тиамине (Л.Н.Классовский, 1972). При 37°C эти вещества становятся необходимыми для полноценного роста.

Многие исследователи считают, что важную роль в жизнедеятельности штаммов чумы играют гематин и его производное – гемин. Эффективность его возросла при его использовании совместно с никотиновой кислотой и тиамином. Механизм этого явления связан, по-видимому, с увеличением интенсивности энергетического обмена за счет участия гемина в образовании цитохромов дыхательной цепи клетки, а также с синтезом каталазы, разрушающей образующуюся при аэробном развитии токсическую для бактерий перекись водорода.

ЗОЛЬНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ И МИКРОЭЛЕМЕНТЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ РОСТА ЧУМЫ

- СЕРА
 - ФОСФОР
 - КАЛИЙ
 - КАЛЬЦИЙ
 - ЖЕЛЕЗО
 - МАГНИЙ
- МИКРОЭЛЕМЕНТЫ
- ВАНАДИЙ
 - МАРГАНЕЦ
 - МОЛИБДЕН
 - НИКЕЛЬ
 - ЦИНК, ЙОД, БРОМ
- Для роста на синтетической среде при 37°C, содержащей соли магния, вирулентные клетки нуждаются в присутствии ионов кальция. Авирулентные штаммы в этих условиях обходятся без кальция (за исключением вакцинного штамма ЕВ). Кальций подавляет синтез антигенов вирулентности, магний – его стимулирует. Кальций и магний влияют на синтез ДНК. Для роста вирулентных клеток необходим баланс между магнием кальцием. Потребность в этих элементах меняется даже при незначительном повышении температуры от 36 до 37°C.

ДЫХАНИЕ

Y.pestis является факультативным анаэробом, способна существовать в аэробных и анаэробных условиях. Как и большинство микроорганизмов, в аэробных условиях в качестве конечного акцептора водорода она использует кислород, в анаэробных – восстанавливает другие вещества.

В жидких средах *Y.pestis* хорошо размножается при нормальном напряжении кислорода, соответствующем содержанию его в атмосферном воздухе, хотя при аэрации, осуществляемой путем непрерывного встряхивания культур или пропускания стерильного воздуха, выход микробных клеток увеличивается. Последнее является следствием насыщения среды кислородом, так как встряхивание культур в разреженном пространстве или пропускание пузырьков азота не улучшает роста. На твердых средах при парциальном давлении кислорода, превышающем 1%, в отсутствие крови или восстановителей микробы быстро погибают (Домарадский И.В.,1958а). В аэробных условиях небольшие посевные дозы микроба на твердой среде не дают того количества колоний, которое получается на жидких средах.

Различие в поведении *Y.pestis* на жидких и твердых питательных средах зависит от уровня окислительно-восстановительного потенциала.

ФЕРМЕНТАЦИЯ *Y.pestis* НЕКОТОРЫХ УГЛЕВОДОВ И СПИРТОВ

СУБСТРАТ	ФЕРМЕНТАЦИЯ ДО КИСЛОТЫ БЕЗ ГАЗА	СУБСТРАТ	ФЕРМЕНТАЦИЯ ДО КИСЛОТЫ БЕЗ ГАЗА
АРАБИНОЗА	ЧАЩЕ ЕСТЬ	МАННИТ	ОБЫЧНО ЕСТЬ
ГАЛАКТОЗА	« ----- »	МАННОЗА	ЕСТЬ
ГЛИКОГЕН	ЕСТЬ	МЕЛИБИОЗА	НЕТ
ГЛИЦЕРИН	ЧАЩЕ ЕСТЬ	МЕЛЕЦИТОЗА	« ----- »
ГЛЮКОЗА	ЕСТЬ	РАМНОЗА	ОБЫЧНО НЕТ
ДЕКСТРИН	ЧАЩЕ ЕСТЬ	РАФФИНОЗА	НЕТ
ДУЛЬЦИТ	ОБЫЧНО НЕТ	САЛИЦИН	ЧАЩЕ ЕСТЬ
ИНОЗИН	НЕТ	САХАРОЗА	ОБЫЧНО НЕТ НЕТ
ИНУЛИН	ОБЫЧНО НЕТ	СОРБИТ	ЕСТЬ
КСИЛОЗА	ЧАЩЕ ЕСТЬ	ФРУКТОЗА	НЕТ
ЛАКТОЗА	ОБЫЧНО НЕТ	ЦЕЛЛОБИОЗА	ЕСТЬ
МАЛЬТОЗА	ОБЫЧНО ЕСТЬ	ЭСКУЛИН	

ФЕРМЕНТАЦИЯ ГЛИЦЕРИНА

Ферментация глицерина (или ее отсутствие) является генетической меткой штамма, но она, как правило, не свидетельствуют о наличии иных особенностей штамма, кроме отношения его к глицерину. Механизм образования глицеринпозитивных или глицериннегативных популяций можно объяснить селекцией соответствующих клонов в адекватных условиях существования. Есть экспериментальные данные о конкурентных взаимоотношениях Gly⁻ и Gly⁺ клеток in vitro и in vivo. По результатам этих исследований селективным преимуществом обладают глицеринпозитивные клетки, однако можно допустить, что в иных условиях более конкурентноспособными будут Gly⁻ клоны.

Глицериннегативные варианты выделяются в тех районах, где хранителями чумы являются крысы и их блохи (океанические штаммы). Глицерин-позитивные варианты обычно выделяются от сусликов, сурков и песчанок (и их блох). В связи с этим распространение глицеринпозитивной разновидности географически связано с ареалом указанных видов грызунов (континентальные штаммы). Океанические штаммы характеризуются еще иной антигенной структурой, среди них обычно не встречаются уреазопозитивные варианты, и их штаммы более требовательны к набору питательных веществ (в частности аминокислот).

Внешняя среда контролирует и обуславливает определенный тип обмена веществ популяции микробов. Для *Y. pestis* внешней средой является организм грызуна или блохи, в которых она паразитирует. Многие исследователи пытались объяснить причину появления глицеринпозитивных штаммов, исходя из особенностей метаболизма их хозяина. По данным Домарадского И.В. (1974) причина негативного отношения чумного микроба к глицерину может заключаться в утрате им только одного фермента – первого в цепи последующих, а именно глицеролдегидрогеназы. Однако, чем объяснить подобную «диссоциацию» чумного микроба: особенностями обмена веществ его хозяев или какими-то другими факторами (абиотическими), пока никто не знает.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЧУМЫ



**МЕТОДЫ
ИССЛЕДОВАНИЯ
В ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ЧУМЫ**

БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЕ

ИММУНОСЕРОЛОГИЧЕСКИЕ

МОЛЕКУЛЯРНО -ГЕНЕТИЧЕСКИЕ

БИОЛОГИЧЕСКИЕ

ОБЪЕКТЫ ЛАБОРАТОРНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ ЧУМЕ

- материал от больных людей
- материал от трупов людей
- трупы верблюдов
- материал от трупов грызунов, диких и домашних животных
- эктопаразиты (блохи, клещи)
- образцы из объектов окружающей среды (костные остатки, погадки хищных птиц, экскременты наземных хищников, субстрат гнезд, почва, смывы с различных поверхностей)

МАТЕРИАЛ ОТ БОЛЬНЫХ ЛЮДЕЙ

- а) -при бубонной и кожно-бубонной формах чумы – пунктат из бубона, при наличии выраженного отека вокруг бубона – дополнительно пунктат из отечной жидкости;**
- отделяемое из вскрывшегося бубона и пунктат из плотной периферической части его;**
- пунктат из содержимого везикул, пустул, карбункулов;**
- отделяемое язв и пунктат из плотного инфильтрата, окружающего язву, кровь;**

МАТЕРИАЛ ОТ БОЛЬНЫХ ЛЮДЕЙ

б) при первичной и вторичной легочной чуме – мокрота, а при ее отсутствии – слизь из зева, кровь;

в) при септической форме чумы (первичный и вторичный сепсис) исследуют кровь;

г) другие материалы берут для исследования в зависимости от выраженности поражений отдельных органов и систем (испражнения при поражении кишечника, спинномозговая жидкость при менингеальных явлениях, моча при наличии в ней крови и т.д.)

МАТЕРИАЛ ОТ ТРУПОВ ЛЮДЕЙ

а) кусочек бубона и материал из кожных поражений (пустула, везикула, язва, отек, карбункул), лимфатические узлы паховые, бедренные, подмышечные, шейные (поверхностные и глубокие), подчелюстные, околоушные, кубитальные, подколенные, а также бифуркационные и лимфатические узлы у корня легких, мезентериальные, илеоцекальные.

МАТЕРИАЛ ОТ ТРУПОВ ЛЮДЕЙ

- в) кровь из полости сердца;
- г) костный мозг: кусочек трубчатой кости (бедро) и губчатой (ребро, грудина)
- д) менингеальная жидкость, экссудат из плевральной полости, мочу (дополнительный материал);
- б) кусочки паренхиматозных органов (селезенка, печень, легкое и др.)

МАТЕРИАЛ ОТ ТРУПОВ ГРЫЗУНОВ

- А) КУСОЧКИ ПАРЕНХИМАТОЗНЫХ ОРГАНОВ (СЕЛЕЗЕНКА, ПЕЧЕНЬ, ЛЕГКОЕ И ДР.
- Б) ПАТОЛОГИЧЕСКИ ИЗМЕНЕННЫЕ ЛИМФАТИЧЕСКИЕ УЗЛЫ (УВЕЛИЧЕННЫЕ, ИЗМЕНЕННЫЕ ПО ЦВЕТУ – РАЗЛИЧНАЯ СТЕПЕНЬ ГИПЕРЕМИИ, УЗЛЫ ЖЕЛТОВАТОГО ЦВЕТА, ОТЕЧНЫЕ, С КРОВОИЗЛИЯНИЯМИ, НЕКРОЗАМИ, НАГНОЕНИЕМ И Т.Д.) – ПОДКОЖНЫЕ, РАСПОЛОЖЕННЫЕ В СКЛАДКАХ КОЖИ НИЖНЕЙ КОНЕЧНОСТИ И ЖИВОТА («ПАХ») И ВЕРХНЕЙ КОНЕЧНОСТИ И ГРУДНОЙ КЛЕТКИ («ПОДМЫШЕЧНАЯ» ОБЛАСТЬ), ПОВЕРХНОСТНЫЕ И ГЛУБОКИЕ ШЕЙНЫЕ, ПОДЧЕЛЮСТНЫЕ И ВИСЦЕРАЛЬНЫЕ – БИФУРКАЦИОННЫЕ, МЕЗЕНТЕРАЛЬНЫЕ И ИЛЕОЦЕКАЛЬНЫЕ;
- В) КРОВЬ ИЗ СЕРДЦА;
- Г) КОСТНЫЙ МОЗГ (У МЕЛКИХ ГРЫЗУНОВ – ИЗ БЕДРЕННОЙ КОСТИ ИЛИ ИЗ ГРУДИНЫ, У КРУПНЫХ, КАК СУРОК, ЗАЯЦ - ИЗ ГРУДИНЫ В МЕСТЕ СОЕДИНЕНИЯ ЕЕ С ХРЯЩОМ РЕБРА); У МЕЛКИХ ГРЫЗУНОВ, КРОМЕ КОСТНОГО МОЗГА, ТАКЖЕ И ГОЛОВНОЙ МОЗГ;

БЛОХИ

- **Блохи, очесанные с грызунов и собранные из гнезд, извлеченных из гнездовой камеры норы, собранные из ходов и из устьев нор и из других мест обитания, включая жилище человека и надворные постройки; в отдельных случаях по эпидпоказаниям блох счесывают с кошек и собак.**





КЛЕЩИ

- **Клеши, счесанные с грызунов (присосавшиеся снимаются пинцетом), собранные из нор, с поверхности земли, вокруг нор, а также снятые с верблюдов, других сельскохозяйственных животных и дополнительно с различных объектов в соответствии с конкретными задачами обследования.**

ТУШИ ВЕРБЛЮДОВ

- Туши прирезанных больных верблюдов и трупы верблюдов, павших в результате заболевания. Сбор материала производится по тому же плану, как и при вскрытии трупа человека.
- а) кусочки паренхиматозных органов (селезенка, печень, легкое, надпочечник и др.);
- б) кусочки лимфатических узлов : подчелюстные, шейные, предлопаточные, «подмышечные» и паховые; мезентериальные, брюшинные (в области почек и ближе к тазу);
- в) кровь из сердца;
- г) отечную жидкость из подкожной клетчатки, если она обнаружена;
- д) от трупов, лежавших при температуре +16°C и выше в течение 5-6 часов, и от трупов с явными признаками разложения – обязательно костный мозг (выпиливают кусок бедренной кости подальше от эпифиза);



ТРУПЫ ДРУГИХ ЖИВОТНЫХ

- Трупы других животных, болеющих чумой
- (по эпизоотическим и эпидемическим показаниям) – зайцы, пищухи, хорьки, ласки, лисы, шакалы, кошки и т.д. Материал для исследования забирают по схемам, описанным выше (от мелких животных – как о грызунов, от крупных как от верблюдов).
- ОБЪЕКТЫ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ
- Пробы почвы, воздуха, смывы с различных поверхностей, пробы воздуха палат госпиталей, где находятся больные легочной формой чумы, погадки хищных птиц.

УПАКОВКА И ТРАНСПОРТИРОВКА

- Каждую пробирку, банку или другую посуду, в которую помещен материал, направляемый для исследования на чуму, закупоривают плотными корковыми пробками (хорошо иметь банки с притертыми стеклянными пробками) и обрабатывают снаружи дезинфицирующим раствором.
- Покрывают колпачками из хлорвинила, воощаной бумаги или полупергаменты и плотно завязывают. Затем каждую посуду в отдельности завертывают в воощеную бумагу или марлю, помещают в металлический бикс, ведро с крышкой или плотный ящик и прокладывают ватой, лигнином или другим упаковочным материалом.
- К каждой отсылаемой пробе прилагают этикетку с указанием всех необходимых сведений о материале. Тару с упакованным материалом опечатывают, на крышке указывают «верх», «осторожно» и отправляют в лабораторию с нарочным. К посылке обязательно прилагают сопроводительный документ, в котором перечисляют объекты исследования и все данные, отмеченные на этикетке каждой банки, пробирки и т.д.

Лабораторная диагностика чумы предусматривает :

- - выделение возбудителя чумы
- - выявление антигенов
- - выявление ДНК
- - определение специфического антигена (Ф1)
- - определение специфических антител.

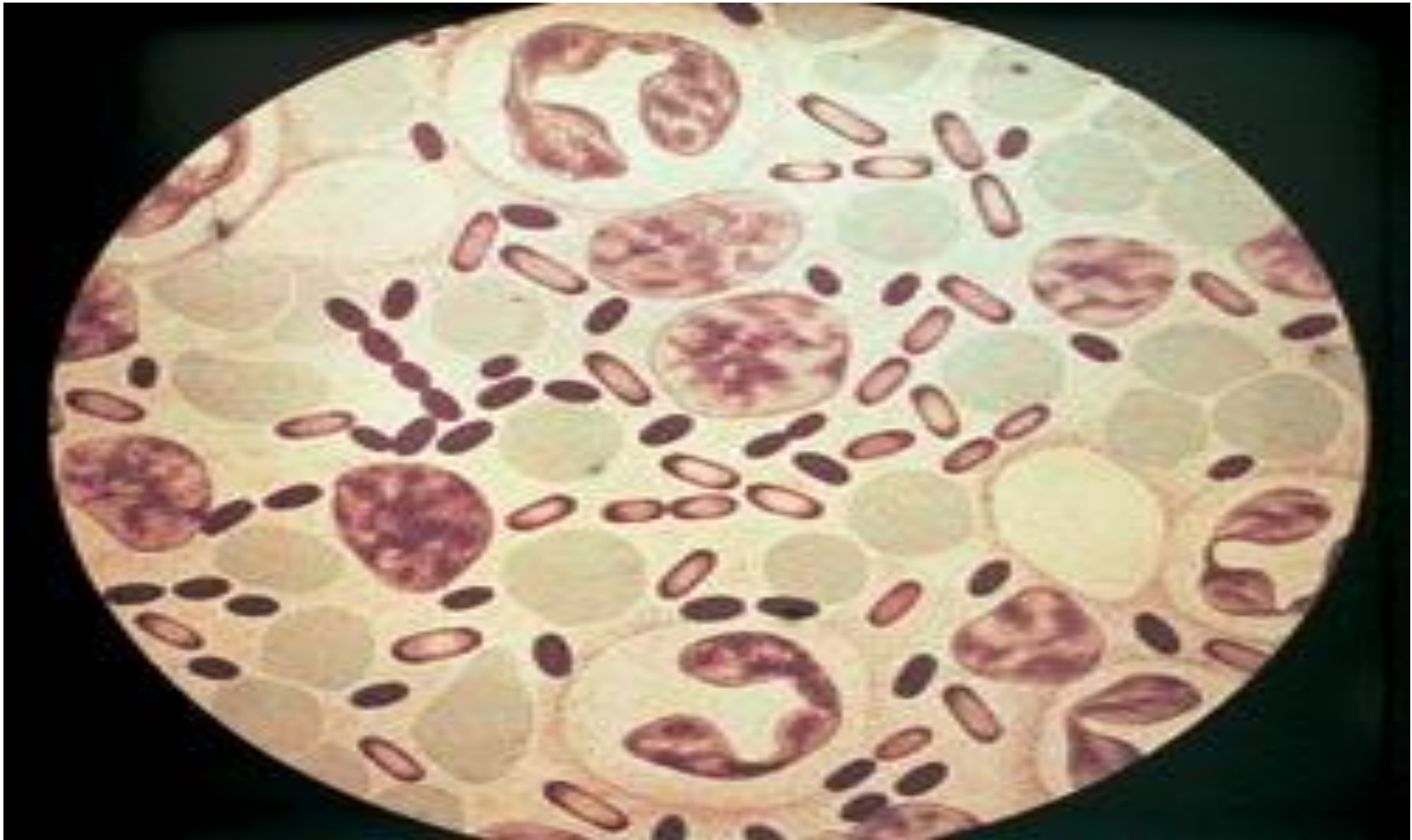
С момента поступления материала проводят:

- - бактериоскопию мазков в световом и люминесцентном микроскопах;
- - бактериологическое исследование, направленное на выделение культуры чумного микроба; биологическое исследование для выделения чистой культуры;
- - иммуносерологическое исследование нативного материала для выявления видоспецифического антигена;
- - молекулярно-генетическое исследование для детекции ДНК-возбудителя.
- - серологическое исследование сыворотки крови людей и животных проводят с целью выявления специфических антител (ретроспективный анализ)

ПОРЯДОК ИССЛЕДОВАНИЯ МАТЕРИАЛА ОТ БОЛЬНЫХ ЛЮДЕЙ, ТРУПОВ, ЖИВОТНЫХ

- 1. микроскопия мазков, МФА
- 2. ПЦР
- РНГА-РНА_m, РТНГА, ИФА – для выявления антигена
- 3. РНГА-РНА_g, РТНГА – выявление специфических иммуноглобулинов
- 4. заражение биопробных животных (микроскопия мазков, МФА; выявление АГ; ПЦР; посев на питательные среды; выделение чистой культуры; идентификация)
- 5. посев на питательные среды (выделение чистой культуры, идентификация)

БАКТЕРИОСКОПИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ



Бактериоскопический метод исследования

- При исследовании материала от больного человека каплю пунктата или отделяемое бубона, содержимое везикулы, пустулы, пунктат из плотных частей карбункула наносят на предметное стекло и растирают платиновой петлей осторожно, не допуская разбрызгивания;
- При приготовлении мазков из мокроты (собранной в чашку Петри) захватывают стерильным пинцетом или петлей комочек с прожилками крови и растирают на стекле.
- Мазки из слизи зева готовят проведением тампоном (одной стороной) по предметному стеклу.
- Кровь для приготовления мазка наносят на стекло с помощью петли или пастеровской пипетки с узким капилляром и растирают платиновой петлей.

Бактериоскопический метод исследования

- При исследовании трупного материала (людей или животных) делают мазки-отпечатки. Для этого от каждого кусочка органа стерильными ножницами отрезают часть и поверхностью свежего среза делают отпечатки на предметном стекле.
- Чтобы получить более тонкие отпечатки, следует вначале сделать несколько оттисков на фильтровальной бумаге, а затем уже на стекле. Обычно на одном предметном стекле делают отпечатки всех органов, располагая их поперек длины стекла в следующем порядке: из лимфатического узла наносят на стекло 4 отпечатка, из селезенки – 3, легкого -2, печени – 1, крови – длинный мазок поперек стекла.

-

Бактериоскопический метод исследования

- Сделать мазки (не менее 6-8)
- Приготовленные мазки высушить на воздухе
Фиксировать погружением в 96% этиловый спирт (или смесь Никифорова) на 30 мин с последующим высушиванием на воздухе.
- Один окрасить 1% водным раствором метиленового синего, второй по Граму, третий обработать ИДЧЛ (иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие чумные лошадиные).
- Остальные мазки оставить неокрашенными для повторных исследованиях.

МЕТОД ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ АНТИТЕЛ (МФА)

Метод флуоресцирующих антител относится к экспресс-методам обнаружения возбудителя чумы и является одним из наиболее специфичных и чувствительных, позволяет обнаружить Ф1 возбудителя чумы через 1-2 часа после начала исследования. Однако положительный результат может быть получен лишь при сравнительно высокой концентрации микробных клеток в исследуемом материале – не менее 1×10^5 м.к./мл.

В качестве сертифицированного препарата используют «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие чумные адсорбированные лошадиные сухие (ИДЧЛ)» производства РосНИПЧИ «Микроб» (Саратов).

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ

Иммуноферментный анализ является ускоренным методом диагностики чумы. Для создания высокоспецифичных диагностических препаратов признано целесообразным использование моноклональных антител (МКА). Для выявления капсульного антигена (Ф1) возбудителя чумы используют сертифицированную систему иммуноферментную моноклональную для идентификации капсульного антигена Ф1 возбудителя чумы (ФГУ «48 ЦНИИ МИНОБОРОНЫ РОССИИ, КИРОВ) или экспериментальную тест-систему производства Ставропольского НИПЧИ. Время анализа составляет 2-4 часа.

Применение иммуноферментного метода позволяет выявлять антиген возбудителя чумы в материале, содержащем чумной микроб в концентрации $1 \cdot 10^5$ - $1 \cdot 10^6$ м.к./мл.

Наиболее перспективной модификацией ИФА является дот-иммуноанализ (ДИА), выявляющий антиген в материале с малой концентрацией чумы. При постановке анализа в качестве твердой фазы используют нитроцеллюлозные мембраны. Дот-иммуноанализ «сэндвич»-методом на бумажных дисках позволяет обнаруживать Ф1 в концентрации 0,4 нг/мл. Метод экономичен, обладает высокой чувствительностью, позволяет получить результат через 2 часа. Возможен визуальный и инструментальный учет результатов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ МФА МАЗКОВ

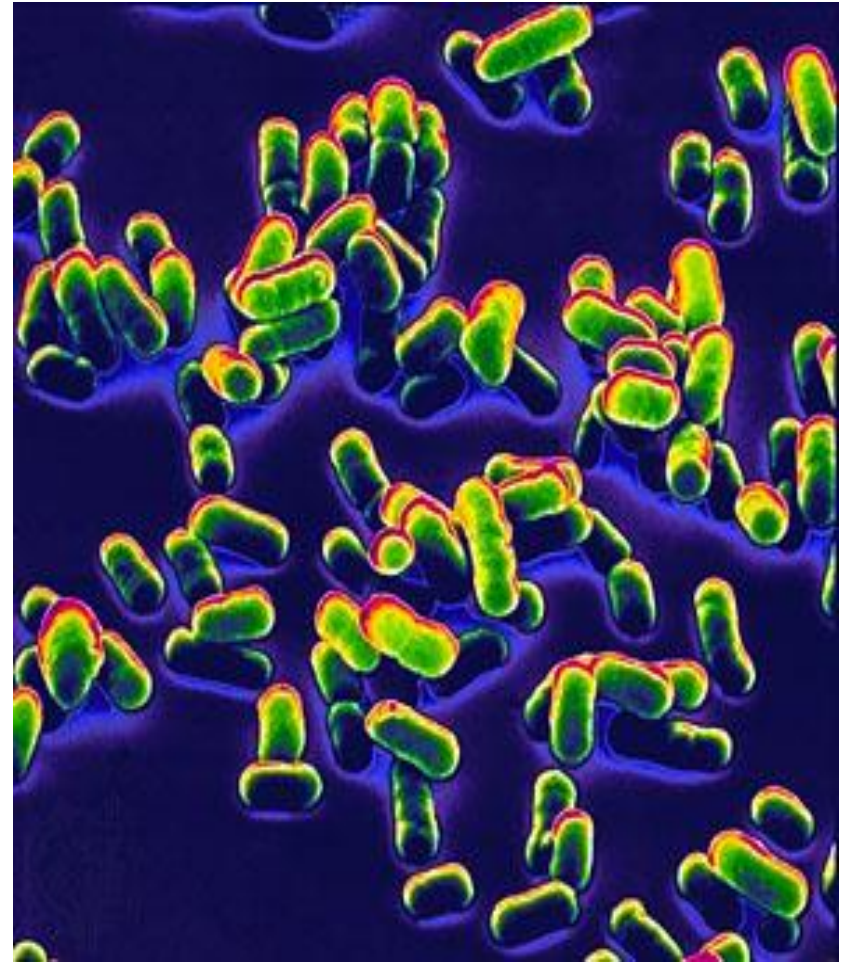
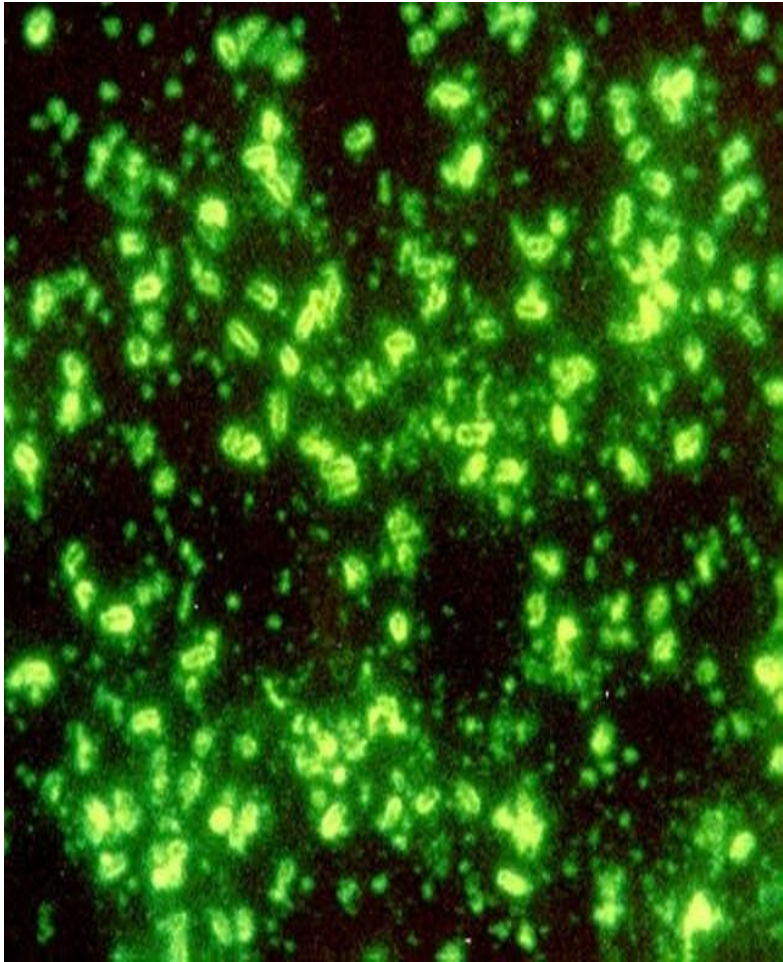
- Мазки из мокроты, содержимого бубона и крови, а также мазки-отпечатки из органов животных готовят на обезжиренных предметных стеклах по общепринятой методике.
- Фиксируют мазки в течение 30 мин в 96° этиловом спирте.
- После окончания фиксации препараты вынимают из спирта и высушивают на воздухе.
- На поверхность фиксированного и высушенного мазка, помещенного во влажную камеру (чашка Петри с кусочком смоченной в воде ваты), с помощью пастеровской пипетки или дозатора наносят каплю ИДЧЛ в рабочем разведении. Окраску производят в течение 20 мин.
- Мазки ополаскивают 2-3 кратно (по 3-5 мин) физраствором, содержащим 0,01 М фосфатный буфер (рН 7,2-7,4). После этого препараты ополаскивают дистиллированной водой и высушивают на воздухе.

**Степень яркости люминесценции бактерий,
«окрашенных» флуоресцирующими
иммуноглобулинами, принято оценивать по
следующей шкале:**

- **4+ - яркая флуоресценция микробной клетки с ярко выраженным ободком по периферии;**
- **3+ - умеренная флуоресценция микробной клетки с четко выраженным ободком по периферии;**
- **2+ или 1+ - слабая равномерная флуоресценция микробной клетки без выраженного ободка.**
- **Специфическим считается свечение с яркостью 4+ или 3+, свечение с яркостью 2+ или 1+ принято считать неспецифическим. Обнаружение светящегося ореола хотя бы у 2-5 клеток в каждом поле зрения свидетельствует о наличии в исследуемом материале чумного микроба.**

ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ





БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ

- *Для посевов используют высокопитательные, предварительно проверенные на ростовые качества среды.*
- *В качестве стимуляторов роста чумного микроба в питательную среду добавляют 2,5% раствор сульфита натрия из расчета 1 мл на 100 мл среды либо 0,05-0,1% свежей или выпускаемой в ампулах гемолизированной крови.*
- *Для подавления роста посторонней микрофлоры к среде добавляют раствор генцианового фиолетового, конечная концентрация которого в среде составляет от 1:100 до 1:800 тыс. в зависимости от конкретного природного очага и степени загрязнения материала, или фосфомицин 50 мкг/мл.*

ПОСЕВ ИЗ ЖИДКОЙ МОКРОТЫ

- Жидкую мокроту с примесью крови платиновой петлей (2-3 петли) или пастеровской пипеткой с широким капилляром наносят на поверхность агара, растирают шпателем или рассеивают частыми штрихами петлей.
- Шпатель или петлю без обжига переносят на вторую и третью пластинки агара и распределяют остатки материала.
- Если мокрота вязкая, то комочек ее с прожилками крови стерильным пинцетом или толстой платиновой (крученой) петлей переносят на поверхность агара и тщательно растирают шпателем или расштриховывают сначала в первой, затем во второй чашке.

ПОСЕВ СЛИЗИ ИЗ ЗЕВА

- Слизь из зева ватным тампоном засевают на питательный агар (обязательно с генциановым фиолетовым).
- Затем тампон с материалом тщательно прополаскивают в 1 мл бульона Хоттингера или Мартена с генциановым фиолетовым и хорошо отжимают о стенки пробирки.
- Полученную в пробирке взвесь используют для заражения биопробных животных.

ПОСЕВ ИЗ СГУСТКА КРОВИ

- Сгусток крови из пробирки осторожно переносят в чашку Петри и нарушают его целостность стерильными препаровальными иглами или неопаянным концом стерильной трубочки, максимально высвобождая от фибрина жидкую кровь.
- Набирают ее в пипетку и засевают во флаконы с бульоном, а 0,1 мл крови сеют на агаровую пластинку, растирая шпателем.
- Остатки крови используют для заражения биопробных животных.

ПОСЕВ ИЗ БУБОНА

- Пунктат из бубона, везикулы (если материала мало, то его разводят в 0,3-0,5 мл бульона) петлей или капилляром пастеровской пипетки засевают на поверхность агара в чашках Петри, распределяя его шпателем или частыми штрихами платиновой петлей, а также вносят в пробирку с бульоном.
- Остатки материала используют для заражения лабораторных животных.
- Материал из вскрывшегося бубона, язвы, карбункула засевают на поверхность агаровых пластинок с генциановым фиолетовым и сульфитом натрия или лизированной кровью.

Посев от больного или трупа

- От каждой пробы производить посев на отдельную чашку с агаром.
- Все посевы помещают в термостат при температуре $(28 \pm 1)^\circ \text{C}$.
- Посевы начинают просматривать через 16-18 часов, когда можно под микроскопом заметить рост культуры чумного микроба в виде плоских фестончатых образований – «платочков», из которых в дальнейшем формируются типичные колонии.
- С этой чашки делают пересев на чашки или в пробирки со скошенным агаром для получения чистой культуры и ее последующей идентификации. На бульоне определяют характер роста.

Колонии возбудителя чумы, развивающиеся при посеве исследуемого материала на агаре с генциановым фиолетовым, следует пересевать параллельно на агар с генциановым фиолетовым и на агар без генцианового фиолетового во избежание возможности потерять выделенную культуру.

Если при этом на агаре без генцианового фиолетового вырастает чистая культура возбудителя чумы, параллельные высевы на агар с генциановым фиолетовым можно прекратить.

Наблюдение за посевами ведут в течение 5 суток. Если за это время не появились колонии, подозрительные на бактерии чумы, а результат исследования биопробных животных отрицательный, исследование считают законченным.

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ

- Полимеразная цепная реакция – ускоренный метод диагностики чумы, направленный на выявление генетических маркеров возбудителя.
- Для индикации чумного микроба используют тест-систему «ГенПест» для выявления ДНК *Y.pestis* методом полимеразной цепной реакции (ТУ 8895-005-01 898 109-2007Ю производства ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Саратов).
- Детекция чумного микроба с помощью данной тест-системы основана на амплификации фрагментов генов *caf1* (плазмида *pFra*) и *pla* (плазмида *pPst*). Одновременное определение двух ДНК мишеней позволяет обнаружить полноценные штаммы чумного микроба и штаммы, лишенные одной из указанных плазмид. Обе плазмиды потенцируют патогенные свойства *Y.pestis*, хотя и не являются основными детерминантами вирулентности. Чувствительность метода $1 \cdot 10^3$ м.к./мл, время выполнения анализа – 4-5 час.



ЗАРАЖЕНИЕ БИОПРОБНЫХ ЖИВОТНЫХ

Пунктаты бубона, везикул, пустул, кровь, суспензия органа(ов), костный мозг, мокроту и другой материал вводят лабораторным животным подкожно: 0,5 мл морским свинкам и 0,2 мл белым мышам – или для ускорения гибели подопытного животного – внутрибрюшинно.

При внутрибрюшинном заражении морским свинкам вводят материал в объеме 0,5-1,0 мл, а белым мышам – 0,3-0,5 мл.

Если имеется предположение, что во вводимом материале возбудитель чумы находится в незначительном количестве, заражающую дозу можно увеличить: для свинки до 1,5-2 мл и вводить подкожно в паховую область, белой мыши – до 0,5 – 1 мл под кожу спины.

ЗАРАЖЕНИЕ БИОПРОБНЫХ ЖИВОТНЫХ

- Если в исследуемом материале предполагается наличие банальной микрофлоры или гнилостных микробов, пользуются методом втирания материала в кожу животного.
- Для этого у биопробного животного выщипывают в области живота участок кожи (у морских свинок размером 4x5 см, у белых мышей 1,5x2 см). Свободное от шерсти место и шерсть вокруг смачивают стерильным физраствором.
- Кожу скарифицируют скальпелем до появления гиперемии и небольших поверхностных кровоизлияний. Материал наносят на этот участок в виде густой взвеси и тщательно втирают плоской поверхностью скальпеля.
- Во избежание разбрызгивания втирание материала производят под прикрытием большой воронки или крышки от чашки Петри.

ЗАРАЖЕНИЕ БИОПРОБНЫХ ЖИВОТНЫХ

- Если исследуемые трупы имеют признаки разложения, то животных заражают отдельно суспензиями из органов и костного мозга.
- Заражение одновременно двумя методами (суспензией органов – накожно, суспензией костного мозга – подкожно или внутрибрюшинно) в ряде случаев помогает сократить сроки установления диагноза и избежать риска гибели животного от посторонней микрофлоры.

ЗАРАЖЕНИЕ БИОПРОБНЫХ ЖИВОТНЫХ

- Кусочки паренхиматозных органов и лимфатических узлов для постановки биопробы растирают в ступке со стерильным кварцевым песком.
- Затем добавляют небольшое количество физраствора, бульона Хоттингера или 1% пептонной воды, тщательно перемешивают и через тонкий слой ваты суспензию набирают в шприц.
- Слизь из зева или вязкую мокроту эмульгируют в физрастворе в стерильной чашке Петри.

УСКОРЕННОЕ УСТАНОВЛЕНИЕ ДИАГНОЗА

- Ускоренному установлению диагноза чумы может способствовать поэтапное исследование биопробных животных.
- Для этого одновременно подкожно и внутрикожно заражают несколько лабораторных животных - морских свинок и белых мышей.
- Последовательно через 1,2,3, сут забивают по одному животному и подвергают исследованию по общепринятой методике. Особое внимание обращают на посевы из места введения материала и регионарных лимфатических узлов. Материал, подлежащий исследованию, высевают параллельно на две агаровые пластинки для одновременной постановки на одной из них пробы с чумным бактериофагом.



- Введение куриного желтка или гидрокортизона лабораторным животным снижает их резистентность к чуме и позволяет ускорить постановку диагноза в случае малой заражающей дозы или снижения вирулентности возбудителя.
- Для постановки биопробы стерильно взятый желток куриного яйца смешивают с 8 мл физраствора, тщательно эмульгируют. Полученную взвесь одновременно с исследуемым материалом вводят животным в объеме 0,5 мл для белой мыши, 1 мл – для морской свинки.
- Гидрокортизон вводят лабораторным животным до заражения в дозе 5 мг в объеме 0,5 мл физраствора под кожу области бедра.

- Для отбора проб мочи животных помещают в зависимости от их размера в 2 - 10 л банки с фиксирующимися крышками. В банки предварительно настилают два листа фильтровальной бумаги, вырезанные по размеру дна, и дают корм: ячмень, пшеницу, кукурузу; для стимуляции диуреза – морковь, капусту. Банки ежедневно меняют.
- Участки подстилки с пятнами мочи вырезают, помещают в пробирки и заливают 4-6 мл 0,1 М буфера с 2% раствором формалина.
- Через 12-24 ч содержимое пробирки уплотняют металлической палочкой, надосадочную жидкость исследуют в системе РНГА-РНAt.
- Обнаружение в пробе капсульного антигена свидетельствует о наличии у животного чумы.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МЕТОДЫ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИНДИКАЦИИ

Гемагглютинационные тесты

Реакция гемагломерации

Гемагглютинационные тесты –

реакция непрямой гемагглютинации (РНГА), реакция торможения непрямой гемагглютинации (РТНГА), реакция нейтрализации антител (РНАт) или антигена (РНАг) – являются методами ускоренной диагностики чумы.

МИКРОМЕТОД

- ❖ Обеззараженный исследуемый материал объемом 150 мкл переносят в пластиковые микропробирки типа «Эппендорф». Для проведения термической обработки проб или бактериальных взвесей используют водяную баню (ультратермостат), оснащенную контактным термометром.
- ❖ Исследуемые образцы в пробирках помещают в водяную баню, прогретую до температуры $(75 \pm 2)^\circ\text{C}$ и выдерживают при этой температуре 30 мин.
- ❖ После термообработки пробы в случае необходимости (выпадение большого количества денатурированного белка или других хлопьевидных примесей) центрифугируют при 1000 об/мин в течение 2-3 мин, используя для дальнейшей работы супернатант.
- ❖ Подготовленный таким образом материал исследуют в системе взаимно контролируемых реакций РНГА-РНAt по обычной методике в объеме 0,025 мл.

Сыворотки крови людей и верблюдов

Сыворотки получают обычным способом и инактивируют при температуре 56°C в течение 30 мин в присутствии мертиолята натрия в конечной концентрации 1: 10 000.

Сыворотки перед исследованием адсорбируют 50% взвесью формализированных эритроцитов барана. Для исследования пригодны и высушенные образцы крови, и сыворотки, для чего фильтровальная бумага (2×2 см), обработанная 0,1% раствором мертиолята натрия и высушенная, пропитывается 0,2 мл крови, а затем высушивается.

Перед исследованием бумажку в пробирке заливают 1 мл 0,9% р-ра натрия хлорида, что соответствует разведению сыворотки 1:10. После 40-минутной экспозиции надосадочная жидкость готова для серологического исследования.

Получение смыва из грудной полости у зверьков

Начинают путем отсепарирования кожи от грудины животного, затем надрезают окологрудинные кости, удаляют грудину, легкие, рассекают крупные сосуды и сердце и мерно вливают в грудную полость небольшое (0,5-1,0 мл) количество физраствора с мертиолятом натрия, разведенным 1:4000.

Все перемешивают и получившуюся жидкость переносят в пробирку. Затем к ней добавляют физраствор с мертиолятом натрия в разведении 1:8000 для окончательного разведения смыва примерно 1:10, что соответствует разведению сыворотки.

Смывы, а также высушенные образцы крови в качестве материала для серологического исследования несколько уступают сывороткам по результативности.

Характеристика эпизоотического процесса

- Определяют класс иммуноглобулинов в сыворотке крови или смывах органов грудной полости грызунов при постановке пробы с 2-меркаптоэтанолом, который избирательно разрушает макроглобулины (Ig M).
- С помощью этих реакций устанавливается давность контакта грызунов с возбудителем чумы. В первые дни после контакта обнаруживаются меркаптоэтанолчувствительные Ig M, в дальнейшем появляются меркаптоэтанолрезистентные Ig G.
- Более того, обнаружение у зверьков меркаптоэтанолчувствительных Ig M, указывающих на незначительное время, прошедшее со времени контакта с возбудителем чумы, дает основание для поиска возбудителя чумы в этом регионе бактериологическим методом.
- При обнаружении меркаптоэтанолрезистентных Ig G выделение культуры чумного микроба маловероятно.

РЕАКЦИЯ ГЕМАГЛОМЕРАЦИИ

В стерильной чашке Петри смешивают платиновой петлей культуру - колонию или каплю суспензии бактериальной культуры с каплей (0,05) мл чумного иммуноглобулинового эритроцитарно диагностикума 2.5% концентрации.

Через 5-7 мин при помощи вогнутого зеркала проводят учет реакции по 4-х балльной шкале:

4+ - полное просветление жидкости и агломерация всех эритроцитов;

3+ - неполное просветление жидкости, агломерация основной массы эритроцитов;

2+ - неполное просветление жидкости, основная масса эритроцитов не агломерирована;

1+ - имеются единичные частицы агломерата

Минус – отсутствие просветления и агломерации эритроцитов.

СОКРАЩЕННАЯ СХЕМА ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ

1. Характерная морфология и отношение к окраске по Граму микробных клеток в мазках из нативного материала (выделения больных, органы трупов людей и животных);
 2. Характерная морфология роста на жидких и плотных питательных средах;
-чувствительность выделенных культур к чумным диагностическим фагам л-413, Покровской и псевдотуберкулезному;
 3. Отсутствие ферментации мочевины;
 4. Способность чумного микроба синтезировать видоспецифический капсульный антиген (Ф1);
 5. Детекция специфической ДНК (при наличии соответствующего оборудования и специалистов);
 6. Чувствительность к антибиотикам методом дисков (при выделении первой культуры);
- Выявление вышеуказанных признаков у бактериальной культуры дает основание для отнесения ее к виду *Y. pestis*.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К БАКТЕРИОФАГАМ

Метод стерильного пятна.

На подсушенную поверхность агара Хоттингера, Мартена, казеиново-дрожжевого или мясопептонного (рН7,2-7,3) наносят 18-20 часовую исследуемую культуру и равномерно распределяют по поверхности.

Затем чашку делят на три сегмента и в центр каждого наносят по одной капле или одной петле диаметром 2 мм чумного Покровской, чумного Л413-С и псевдотуберкулезного бактериофагов.

Агаровые пластинки подсушивают, переворачивают и ставят в термостат на 15-18 часов при температуре 28°C.

Если исследуемая культура принадлежит к чумному микробу, то на месте нанесения чумного бактериофага образуется “стерильное пятно” - положительный результат.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К БАКТЕРИОФАГАМ

Двухслойный метод.

В пробирку с 2,5-4,5 мл 0,7% агара (на любой питательной основе), расплавленного и остуженного до температуры 46°C, добавляют 0,1 мл суспензии, содержащей 1×10^9 м.к. 18-часовой агаровой культуры, и выливают на агаровую пластинку в чашку Петри. Чашки с полуприкрытыми крышками подсушивают при комнатной температуре 20-30 мин. Затем наносят фаг, как говорилось ранее. Посевы инкубируют в термостате при температуре 28°C. Результаты учитывают через 18, в экстренных случаях – через 12 часов. Чашки рассматривают в проходящем свете.

Наличие лизиса в виде одного стерильного или четко контурированного “мутного” пятна или группы мелких пятен на месте нанесения трех бактериофагов оценивают как положительный результат.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К БАКТЕРИОФАГАМ

Метод диагностических рабочих разведений.

Дифференциальный рабочий титр (ДРТ) бактериофага чумного - наибольшее разведение фага, одна капля которого способна образовывать стерильное пятно на газоне со штаммами чумного микроба и не образовывать в этих разведениях стерильных пятен со штаммами псевдотуберкулезного микроба.

Расплавленный 1,5% агар, приготовленный на любой питательной основе (рН 7,2), разливают в чашки Петри и после застывания подсушивают 30 мин в опрокинутом состоянии под углом над своими крышками. На дне чашки вычерчивают по 8 квадратов в ряд. В пробирку с 4,5 мл расплавленного и остуженного до температуры 46-47°C 0,7% агара добавляют 0,1-0,2 мл 18-20 часовой бульонной культуры испытуемого штамма и после равномерного перемешивания выливают на подготовленные вышеуказанным способом чашки. После застывания нанесенного слоя агара с культурой петлей диаметром 2 мм наносят капли цельного и разведенного чумного фага 10^1 по 10^7 . После подсыхания капель чашки переворачивают и инкубируют при температуре 28°C в течение 18-20 часов.

Исследуемая культура относится к возбудителю чумы, если она лизируется цельным фагом Л-413С. Пробу с бактериофагами чумным Покровской (отличающимся от фага Л-413С по механизму специфического действия, серотипу и меньшей специфичностью) и псевдотуберкулезным ставят только в том случае, если культура, подозрительная на принадлежность к возбудителю чумы, не лизируется фагом Л-413С.

При использовании фага Покровской исследуемая культура является чумным микробом, если она лизируется в разведении ниже ДТР и выше. Если исследуемая культура лизируется в разведении ниже ДТР, то вопрос о принадлежности ее к чумному или псевдотуберкулезному микробам должен быть решен с помощью других дифференциальных тестов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТАЦИИ МОЧЕВИНЫ

В настоящее время используют среды Кристенсена и Тимофеевой (среда для идентификации чумного и псевдотуберкулезного микробов по признаку ферментации углеводов и мочевины, сухая – ЦДС), а также метод, предложенный Г.Н. Ленской.

-На скошенную поверхность агара Кристенсена засевают 2-суточную агаровую культуру изучаемого штамма и инкубируют при температуре 28°C . Штаммы псевдотуберкулезного микроба в процессе роста окрашивают среду в розовый или малиновый цвет. Штаммы чумного микроба не изменяют цвета среды.

-При посеве возбудителя чумы на цветную дифференциальную среду, предложенную Л.А.Тимофеевой, он через сутки инкубации при температуре 28°C изменяет исходную темно-зеленую окраску среды до красно-оранжевой (столбик) и сине-зеленой (косячок) вследствие полной или неполной ферментации глюкозы в анаэробных и аэробных условиях соответственно. Псевдотуберкулезный микроб вызывает изменение окраски как столбика, так и косячков в синий цвет за счет ферментации мочевины.

-По методу Г.Н. Ленской к 100 мл стерильного физраствора строго стерильно добавляют 2% кристаллической мочевины и 1% спиртово-водного раствора фенолфталеина, не подвергая раствор кипячению, чтобы не снижать интенсивность реакции, затем его разливают по 4 мл в стерильные пробирки. Легкая опалесценция, наступающая после добавления фенолфталеина, обычно исчезает через несколько часов. Культуру 2-3 суточного возраста, выращенную при температуре 28°C , растирают петлей непосредственно в пробирке со средой до концентрации в $1-2 \times 10^9$ м.к./мл. В связи с тем, что в типичной культуре псевдотуберкулезного микроба содержится свободная уреаза, среда окрашивается в розовый или малиновый цвет. В пробирках с посевами культур чумного микроба ферментации мочевины не наступает и среда остается бесцветной. Используют только свежеприготовленную среду.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПОСОБНОСТИ СИНТЕЗИРОВАТЬ АНТИГЕН

Ф1

Обнаружение Ф1 возбудителя чумы проводится:

в случаях, когда затруднено бактериологическое исследование, а выделение культур чумного микроба маловероятно или невозможно

- в целях экспресс - и ускоренной диагностики при исследовании нативного материала

- после накопления возбудителя в организме лабораторных животных (биопробы) и на питательных средах для идентификации выделенной культуры. Объектами исследований являются трупы и выделения людей, верблюдов, других крупных и мелких животных, грызунов, погадки хищных птиц и фекалии наземных хищников, костные остатки, блохи и другие эктопаразиты, посевы на плотных и жидких питательных средах, заросшие посторонней микрофлорой.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПОСОБНОСТИ СИНТЕЗИРОВАТЬ АНТИГЕН Ф1

У свежих трупов исследуют селезенку и печень, у загнивших – почки, легкие, костный мозг, лимфатические узлы и кожу. У мумифицированных трупов исследуют крупные трубчатые кости и кожу для приготовления суспензии. При наличии кожной язвы, характеризующей кожную форму чумы у больного или трупа, серологическому исследованию подлежит взвесь из корочки вокруг язвы. Материал измельчают, экстрагируют 1-2% раствором формалина на физрастворе.

Из погадок хищных птиц при помощи 1% раствора формалина (лучше на 0,1 М фосфатно-солевом буфере, рН 7,2-7,4) готовят в ступке суспензии костных и кожных остатков. Перед исследованием их можно объединить, дать отстояться, отобрать надосадочную жидкость. Экскременты наземных хищников (ласка, хорь, волк, лисица) заливают несколькими мл 1% раствора формалина, растирают и оставляют до следующего дня, после чего исследуют. Костные остатки (с определением видовой принадлежности или без такового) исследуют индивидуально или группами по 20-25 штук, измельчая в ступке и заливая 1% раствором формалина на физрастворе, примерно из расчета 10 частей на 1 часть массы костей.

При серологическом исследовании суспензий блох применяют предварительное подращивание содержащихся в материале микроорганизмов на питательных средах при температуре 37°C в течение 48 часов. В пробирку с блохами (до 20 экз.) добавляют 2-3 мл бульона Хоттингера, содержащего сульфит натрия (0,03%), генциановый фиолетовый (0,0003%) и неионогенный детергент ОП-7 (3%). После подращивания культуру микроорганизмов обеззараживают добавлением в пробирку формалина до 2% концентрации. Исследованию подвергают надосадочную жидкость.

Культуры возбудителя чумы с плотных питательных сред, заросших посторонней микрофлорой, выдерживают 24 часа в термостате при температуре 37°C, затем обеззараживают добавлением в чашку Петри со средой 3-4 мл 2% раствора формалина. Через 12 часов надосадочную жидкость исследуют на наличие Ф1.

ПЦР ДЛЯ УСКОРЕННОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ КУЛЬТУР ЧУМНОГО МИКРОБА

- ❖ ПЦР используют для подтверждения принадлежности выделенных культур или подозрительных колоний к виду *Y.pestis*, а также для ускоренной дифференциации авирулентных штаммов чумного микроба от вирулентных.
- ❖ Выявление видоспецифичных плазмид pFra и pPst осуществляют с помощью тест-системы “ГенПест”.
- ❖ Подтверждение принадлежности выделенных культур к виду *Y.pestis*, а также дифференцирование авирулентных штаммов чумного микроба от вирулентных проводят с помощью экспериментальных серий “Мульти -Yp” тест -системы для детекции и характеристики чумного микроба по вирулентности методом мультилокусной ПЦР”, разработанной в РосНИПЧИ “Микроб”.
- ❖ Принцип метода заключается в одновременной амплификации фрагментов видоспецифичного для возбудителя чумы хромосомного локуса (3a) и двух генетических маркеров, ассоциированных с вирулентностью: ген *irp2* (остров высокой патогенности) и ген *icrV* (плазмиды pCad). ПЦР проводят в соответствии с инструкцией к тест-системе.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ТЕСТЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ДЛЯ ОКОНЧАТЕЛЬНОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПРИ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ЧУМЫ

- ❖ Нитрофицирующая и денитрифицирующая способность**
- ❖ Определение подвижности**
- ❖ Ферментация глицерина**
- ❖ Определение чувствительности к пестицину**
- ❖ Определение признака пигментсорбции**
- ❖ Зависимость роста от ионов кальция при температуре 37°C**
- ❖ Определение пестициногенной активности**
- ❖ Определение фибринолитической активности**
- ❖ Определение плазмокоагулирующей способности**
- ❖ Определение чувствительности к антибактериальным препаратам**

Ферментация глицерина

Ферментация глицерина (или ее отсутствие) – признак, по которому штаммы чумного микроба делят на океаническую (*biovar orientalis*) и континентальную (*biovar antique* и *medievalis*) расы Gly – и Gly + соответственно.

Отношение к глицерину изучают на пластинках агара Коля-Белькура или Касаткина. Одну петлю 1- или 2-х суточной испытуемой агаровой культуры наносят на агаровую пластинку среды в виде полоски. Среда с посевами инкубируют при температуре 28°C. Результаты учитывают через 1-3 суток. Штаммы чумного микроба, циркулирующие в природных очагах, где основными носителями являются сурки, суслики, полевки, пищухи, ферментируют глицерин и растут на агаре Коля-Белькура в виде красной полосы, окрашивая часто и толщу агара вокруг посева. Штаммы, выделяющиеся в очагах, где основными носителями являются крысы, не ферментируют глицерин и растут на агаре Коля-Белькура в виде серовато-белой полоски. Изучать ферментацию глицерина в жидкой среде не рекомендуется, так как расщепление его в такой среде запаздывает, что может привести к ошибочным выводам.

В среду Касаткиной глицерин вносят до 2% концентрации. На агаровые пластинки высевают 100-200 м.к. 24-48-часовой агаровой культуры чумного микроба. При ферментации глицерина вырастают красно-оранжевые колонии, при отсутствии – колонии цвета среды.

Нитрифицирующая и денитрифицирующая способность

Нитрифицирующая и денитрифицирующая способность служат критериями разделения штаммов чумного микроба на различные биовары. Способны образовывать нитриты биовара *antique* и *orientalis*, штаммы биовара *medievalis* нитриты не образуют.

Для испытания нитрифицирующей способности одну петлю испытуемой 1- или 2-х суточной культуры засевают в 1 мл бульона Хоттингера или Мартена (рН 7,1 – 7,2), а для выявления денитрифицирующей способности штамма его сеют в 1 мл той же серии бульона, но с добавлением 0,1% азотно-кислого калия (KNO_3). Бульон предварительно проверяют на отсутствие нитритов путем прибавления к 1 мл 0,5 мл реактива Грисса (бульон не должен менять цвет).

Посевы помещают в термостат при температуре 28°C и через 3 суток в обе пробирки прибавляют по 0,5 мл реактива Грисса. В положительных случаях сразу появляется розовое окрашивание, что указывает на наличие в посевах нитритов (в первом случае они образовались за счет аммиака, во втором – из солей азотной кислоты). О степени интенсивности реакции судят по окраске; от еле заметной розовой до малинового цвета. При количественном определении денитрифицирующей активности к 2-кратным разведениям 3-х суточных культур в бульоне или физрастворе добавляют по 0,5 мл реактива Грисса и оценивают также по интенсивности окраски:

1+ бледно-розовая,

2+ - розовая,

3+ - малиновая,

4+ - темно-малиновая.

Положительной считают реакцию при окраске среды на 2+.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОДВИЖНОСТИ

При изучении подвижности чумного микроба, помимо метода исследования в висячей капле, можно проводить посев культуры в столбик 0,3% полужидкого агара по Пешкову. Возбудитель чумы растет только по ходу укола петли, что свидетельствует об отсутствии подвижности. Для дифференциации возбудителя чумы от подвижных бактерий возбудителя псевдотуберкулеза, которые диффундируют в питательную среду в виде облачка, культуру выращивают при температуре 20-22°C и выдерживают длительное время (48-72 часа), так как в отдельных штаммах псевдотуберкулезного микроба активно подвижных клеток может быть мало и нужно время для их накопления и диффузного распределения в толще агара.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ПЕСТИЦИНУ

Определение чувствительности к пестицину проводят методом отсроченного антагонизма.

На поверхность агаровой пластинки в центре чашки с помощью петли наносят бляшкой 1-2-суточную культуру продуцента пестицина и выращивают в термостате при температуре 28°C в течение 48 час. Затем выросшие макроколонии стерилизуют в парах хлороформа (кружки фильтровальной бумаги вкладывают в чашку Петри, наносят на них хлороформ, а чашки помещают в эксикатор на 1-2 часа).

После стерилизации в парах хлороформа фильтровальную бумагу удаляют, и посеvy выдерживают при комнатной температуре до полного исчезновения запаха хлороформа при приоткрытых крышках чашек. Затем на поверхность агаровой пластинки выливают 4,5 мл расплавленного и остуженного до температуры 47-51°C 0,75% агара, содержащего 0,5 мл 4-х часовой бульонной культуры исследуемого штамма.

Посевы инкубируют при температуре 28°C. Если исследуемый штамм проявляет чувствительность к пестицину, вокруг колонии продуцента образуется зона задержки роста этого штамма.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИЗНАКА ПИГМЕНТСОРБЦИИ

На поверхность синтетической среды с гемином Джексона-Берроуза наносят 0,1 мл взвеси односуточной агаровой культуры исследуемого штамма, содержащей в 1 мл 5×10^3 м.к. По стандарту мутности (посевная доза 500 микробов). Каплю суспензии растирают шпателем по поверхности агара. Посевы инкубируют в течение 5 суток при температуре 28°C. В качестве контроля используют вакцинный штамм EB (Pgm).

Как правило, вирулентные бактерии чумы вырастают в виде небольших черно-бурых колоний (Pdm+), а бактерии, утратившие вирулентность, образуют более крупные бесцветные колонии (Pgm-).

Признак пигмент сорбции удастся выявить на обычном агаре Хоттингера, содержащем в качестве красящего вещества конгокрасный. Наилучшими условиями для проявления пигментсорбции этим методом являются содержание в среде 0,05 мг/мл конгокрасного и выращивание изолированных колоний в течение 1-2 суток при температуре 28°C с последующим выдерживанием их при температуре 4°C в течение 2-3 суток.

Для определения признака пигментации у штаммов чумного микроба разработана цветная дифференциально-диагностическая полусинтетическая среда HmsD. Признак пигментации (Hms) определяют, высевая на поверхность полусинтетической среды с конгокрасным (среда HmsD) 0,1 мл взвеси 1-суточной агаровой культуры исследуемого штамма, содержащей 5×10^3 м.к./мл по стандарту мутности при температуре 26-28°C в течение 2 -х суток. Через 2 суток большинство штаммов чумного микроба вырастают в виде пигментированных колоний розового цвета (разной интенсивности в зависимости от подвиговой принадлежности штамма) и непигментированных бесцветных колоний. Штаммы некоторых подвигов чумного микроба (улегейский подвид) вырастают на 3 сутки. Основные достоинства данной среды – стандартность, простота приготовления, высокие ростовые качества, позволяющие исследовать штаммы с различными питательными потребностями; быстрая (48-72 ч) и качественная дифференциация колоний *Y. pestis* по признаку пигментации, возможность изучения реверсии этого признака.

ЗАВИСИМОСТЬ РОСТА ОТ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ ПРИ ТЕМПЕРАТУРЕ 37°C

Для исследования на среде Хигучи-Смита (магниево-оксалатный агар) односуточные агаровые культуры суспендируют в холодном физрастворе с таким расчетом, чтобы в 0,1 мл содержалось 1×10^2 , 1×10^3 и 5×10^4 бактерий, которые в этих количествах высевают на чашки Петри с магниево-оксалатным агаром.

Посевы инкубируют при температуре 37°C. Через 48 часов проводят подсчет выросших колоний (кальцийнезависимые). Дальнейшее их выращивание осуществляют при температуре 28°C. Через 24 часа проводят учет выросших кальцийзависимых колоний. В качестве контроля на агаровые пластинки с 5% нативной крови высевают такие же дозы (1×10^2 , 1×10^3 и 5×10^4) вакцинного штамма *Y. pestis*

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕСТИЦИНОГЕННОЙ АКТИВНОСТИ

Для определения пестициногенной активности поверхность чашки с агаром делится на несколько секторов и в центре каждого из них делается посев 1-2 сут агаровой культуры исследуемых штаммов таким образом, чтобы получить бляшку диаметром 0,5 см. Для контроля на один из секторов засевают заведомо пестициногенный штамм *Y. pestis* EV.

Посевы инкубируют при температуре 28°C в течение 48 часов. Затем выросшие “макроколони” стерилизуют в парах хлороформа (кружки фильтровальной бумаги вкладывают в крышку чашки Петри, наносят на них хлороформ, а чашки помещают в эксикатор на 2 часа или на ночь). После стерилизации фильтровальную бумагу удаляют, и посевы выдерживают при комнатной температуре до исчезновения запаха хлороформа при приоткрытых крышках чашек. Затем на поверхность агаровой пластинки выливают 4, 5 мл расплавленного и остуженного до температуры 47-51°C 0,75% агара, содержащего 0,5 мл 4-х часовой бульонной культуры псевдотуберкулезного микроба 1 серотипа. Посевы инкубируют при температуре 37°C. Учет результатов осуществляют через 24 и 48 часов.

Положительный результат – способность образовывать пестицин – отмечается в том случае, если “макроколони” исследуемых культур окружены зоной полного или частичного торможения роста индикаторного штамма. Культуры, не обладающие пестициногенной активностью, не подавляют рост штамма-индикатора. Для определения пестициногенности штаммов предпочтительнее применять агар Хоттингера (рН 7,2 с 1% сухого пептона, на котором получают более четкие результаты).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Определение фибринолитической активности чумного микроба проводят с использованием плазмы крови, для чего нативную плазму (человеческую) или цитратную кроличью разводят физраствором 1:8 или 1:10 и разливают по 0,5 мл в пробирки. Затем готовят взвеси бактерий из односуточных культур, содержащих по 1×10^9 м.к./мл. По 0,25 мл взвеси исследуемого штамма вносят в пробирку с плазмой, перемешивают и добавляют 0,1 мл 0,5% стерильного раствора кальция хлорида.

В качестве контролей используют 0,5 мл плазмы в таком же разведении, 0,25 мл физраствора и 0,1 мл 0,5% раствора кальция хлорида; 0,5 мл плазмы, 0,25 мл 1-миллиардной взвеси 1-2 суточной агаровой культуры *Y. pestis* EV и 0,1 мл 0,5 % стерильного раствора кальция хлорида (для контроля свертывания плазмы). Посевы инкубируют при температуре 37°C. Через 40-60 мин после помещения в термостат проверяют образование сгустка. Если за 60 мин сгусток не образовался, реакцию следует повторить.

Учет результатов производят через 18-20 часов и оценивают следующим образом:

4+ - полное растворение сгустка

3+ - почти полное растворение сгустка, на поверхности плазмы очень маленькая пленка;

2+ - небольшой сгусток плавает в большом количестве плазмы;

1+ - очень небольшое количество жидкой плазмы при хорошо сформированном сгустке;

минус - сгусток, заполняющий всю пробирку.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЛАЗМОКОАГУЛИРУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ

Для определения плазмокоагулирующей способности цельную нативную человеческую или цитратную кроличью плазму разливают по 0,5 мл в пробирки и затем в каждую из них засевают полную петлю диаметром 1 мм 1-2 суточной культуры исследуемых штаммов.

В качестве контролей используют 0,5 мл плазмы и петлю агаровой культуры чумного микроба *Y. pestis* EB; 0,5 мл плазмы без каких-либо добавлений. Посевы инкубируют при температуре 28°C.

Учет результатов производят через каждый час после начала инкубации с просмотра контрольных пробирок: плазма без культуры должна быть жидкой, а в пробирке с культурой штамма *Y. pestis* EB через 1-2 ч образуется сгусток. Как правило, через 2 ч инкубации большинство исследуемых культур дают положительные результаты.

Если через 2-3 ч сгусток не образовался, наблюдение надо продолжить до срока образования полного или частичного сгустка и далее до уменьшения в размерах сформировавшегося сгустка, свидетельствующего о начале фибринолизиса. Полное его растворение может быть зарегистрировано не позднее, чем через 24 часа. Если в течение 24 ч наблюдения (через каждый час) сгусток не сформировался, пробу на плазмокоагуляцию считают отрицательной.

Результаты оцениваются следующим образом:

4+ - образование плотного сгустка, заполняющего всю пробирку и с трудом отделяющегося от стенок пробирки;

3+ - образование довольно плотного сгустка, легко отделяющегося от стенок пробирки и небольшое количество жидкости;

2+ - хорошо сформированный сгусток и небольшое количество жидкости в пробирке;

1+ - небольшой сгусток, плавающий в плазме;

± - еле заметная пленка;

минус – наличие жидкой плазмы в пробирке.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ

При исследовании материала от больного и от трупов людей, при угрожающей эпидемиологической обстановке (интенсивная эпизоотия, большой процент зараженных блох в сочетании с реальной возможностью контакта с ними людей, эпизоотия на домовых мышах в населенных пунктах), немедленно вслед за появлением колоний чумного микроба в посевах из нативного материала определяют чувствительность возбудителя к антибиотикам, применяемым для лечения и экстренной профилактики чумы. Определение антибиотикочувствительности проводят методом дисков фабричного производства на плотных питательных средах с добавлением стимуляторов роста чумного микроба.

Оценку результатов определения чувствительности выделенных штаммов проводят по величине диаметра зоны задержки роста, включая диаметр самого диска. Определение антибиотикочувствительности выделенной культуры чумного микроба диско-диффузионным методом является качественным. Более точное представление об активности антибиотиков дает метод серийных разведений в жидких и плотных питательных средах, позволяющий определить минимальные подавляющие концентрации (МПК) для данного микроба. Жидкие питательные среды употребляют при проверке единичных штаммов, плотные – при одновременном изучении нескольких штаммов чумного микроба.



Определение чувствительности к антибиотикам диско-диффузионным методом

Диск с антибиотиком помещается на поверхность питательной среды после посева культуры бактерий. В результате диффузии антибиотика из диска рост чувствительного возбудителя подавляется (зона задержки роста). Метод стандартизован только для «быстрорастущих» микроорганизмов, образующих сплошной рост на плотной питательной среде (в виде «газоны») через 18-20 часов инкубации. Светлокожая палочка (*Staphylococcus aureus*) природно устойчива ко многим антибиотикам. Для лечения инфекций, вызванных *S. aureus*, применяют бета-лактамы, антиколонины, аминогликозиды и линкозамы.

Рис. 315. Определение чувствительности синтетической палочки к антибиотикам



Положительный окончательный ответ о наличии в исследуемом материале возбудителя чумы дается на основании выделения чистой культуры возбудителя и результатов ее идентификации. Положительные результаты иммуносерологических реакций дают право на ориентировочный положительный ответ.

Ретроспективный диагноз ставится на основании выявления специфических антител у переболевших людей и при эпизоотологическом обследовании природного очага чумы или другой территории у грызунов.

Лабораторная диагностика чумы у людей имеет особенности в случаях, когда лечение было начато ранее взятия материала или заболевшие лица ранее были привиты чумной вакциной. Лабораторная диагностика в условиях антибиотикотерапии осложняется. В этих условиях при отрицательном бактериологическом исследовании более эффективна серологическая диагностика чумы, основанная на обнаружении антител к Ф1.

У вакцинированных людей заболевание развивается медленнее. В первые дни заболевания важно определить в сыворотке крови антитела, образовавшиеся в ответ на введение вакцины, а также их принадлежность к IgM и IgG. Через 2-3 нед заболевания титры антител будут выше. Их увеличение имеет диагностическое значение. Выделить культуру возбудителя от заболевших привитых людей труднее, чем от непривитых. Использование ПЦР-анализа при выявлении специфичной ДНК дает дополнительные свидетельства о наличии возбудителя в исследуемом материале.

Примечания:

При соответствующих показаниях все среды при исследовании грызунов обрабатывают антифаговой сывороткой. Пересевы культуры, выделенной на этих средах, делают параллельно на такие же среды, не обработанные антифаговой сывороткой. При развитии на средах без антифаговой сыворотки колоний без следов поражения бактериофагом пересевы на средах, обработанных антифаговой сывороткой прекращают.

Если на чашках с посевами любого нативного материала нельзя в течение 36-48ч отметить развитие колоний возбудителя чумы, наблюдение за посевами продолжают в течение 5 сут. Только по истечении этого срока можно считать, что посев дал отрицательный результат. Наблюдение за посевами крови больного во флаконах с бульоном проводят до момента появления в нем роста, характерного для возбудителя чумы, а при отрицательном результате – в течение 5 сут.

Если биопробные животные не погибают сами, их вскрывают: зараженных внутрибрюшинно и подкожно – на 5-7 сутки после заражения; зараженных накожно – на 7-9 сут после заражения. Наблюдение за посевами от них проводят в течение 5 сут.

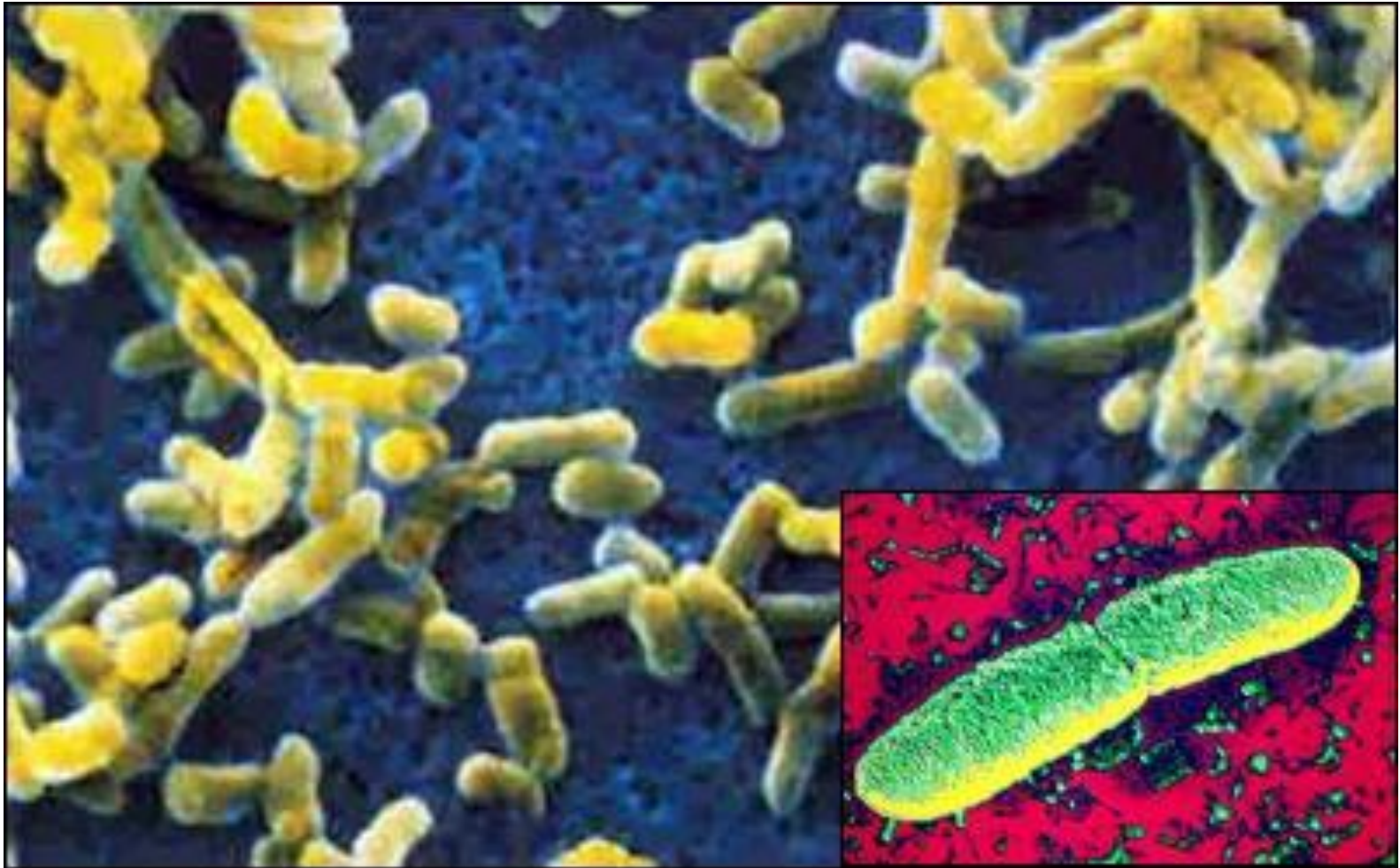
С суспензией органов забитых биопробных животных ставят РНГА с антительным и РНАт с антигенным диагностикумами для обнаружения Ф1, а с кровью из сердца – РНГА с антигенным и РНАг с антительным диагностикумами для определения специфических антител в крови биопробных животных.

Ускоренные методы диагностики применяют на каждом этапе при условии наличия соответствующего оборудования и бакпрепаратов.



**Борьба съ чумою.—Французскій
врачь Іерсень.**

ЧУМНАЯ ПАЛОЧКА

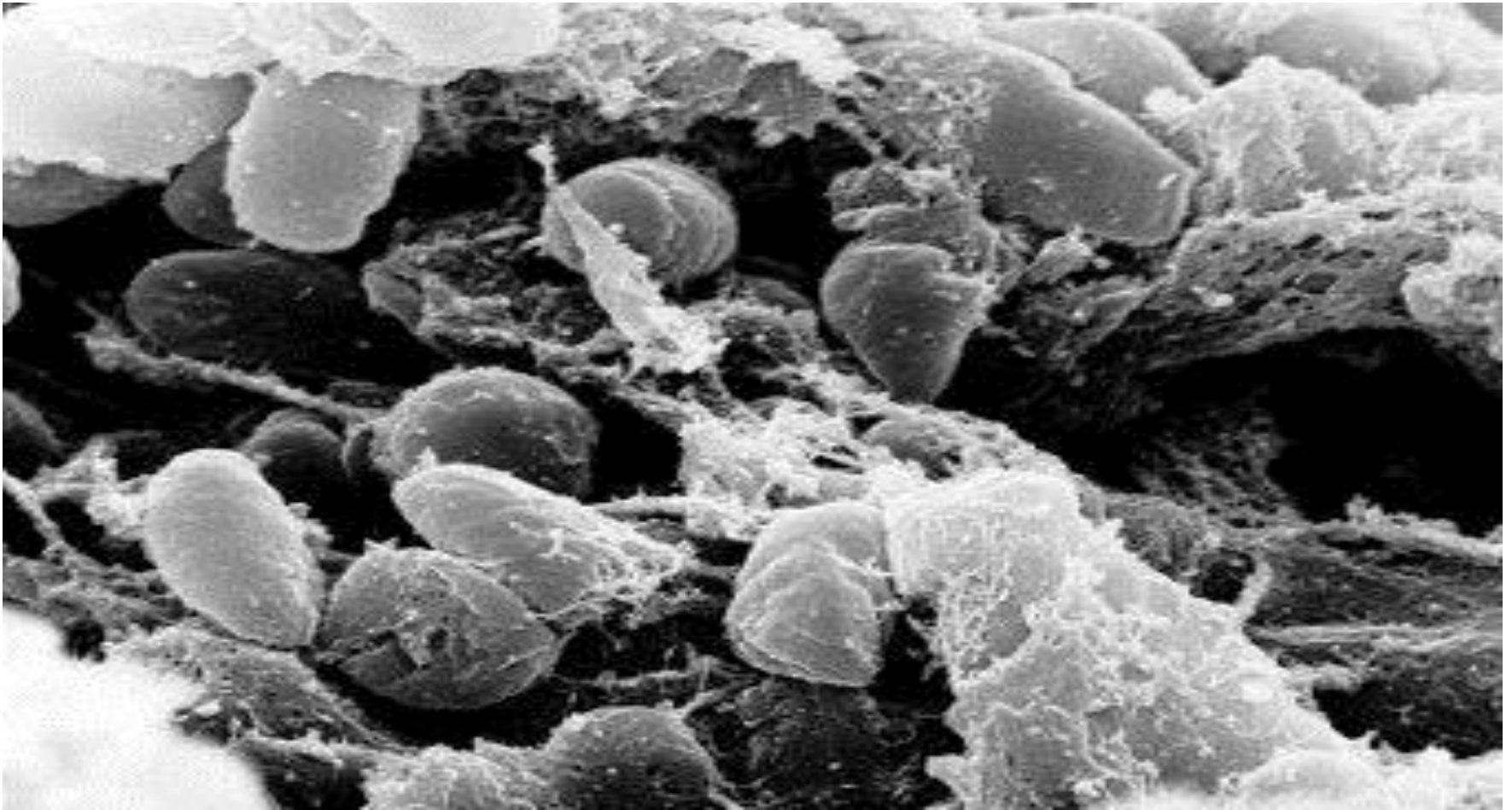


Чумная палочка

Опасность заражения чумой



РЕКОНСТРУИРОВАННЫЙ ГЕНОМ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ



Разновидность бубонной чумы



