

**Микробиология и  
лабораторная  
диагностика  
возбудителей особо  
опасных инфекций  
(сибирская язва, бруцеллез)**



# БРУЦЕЛЛЕЗ

**Бруцеллез** – острая зоонозная инфекция, вызываемая бактериями рода *Brucella*, характеризующаяся волнообразным течением и имеющая высокую потенциальную возможность перехода в хроническую форму.

# История открытия возбудителя

- Бруцеллез, как самостоятельная нозологическая форма была описана Мерстоном [Marston J.A., 1861] под названием «средиземноморская ремитирующая или гастрическая ремитирующая лихорадка» (мальтийская лихорадка).
- В 1896 г. английским ученым D. Bruce в мазках селезенки человека, умершего от мальтийской лихорадки, был обнаружен возбудитель, такие же микроорганизмы были выявлены им в пунктате селезенки больных людей. В 1897 г. Брюс выделил возбудителя в чистом виде и назвал его *Micrococcus melitensis*.

До 1986 г. род *Brucella* был представлен 6 самостоятельными видами, в который выделялись биовары

*B. melitensis* – 3 биовара,

*B. abortus* – 7 биоваров,

*B. suis* – 5 биоваров,

*B. neotomae*,

*B. ovis*,

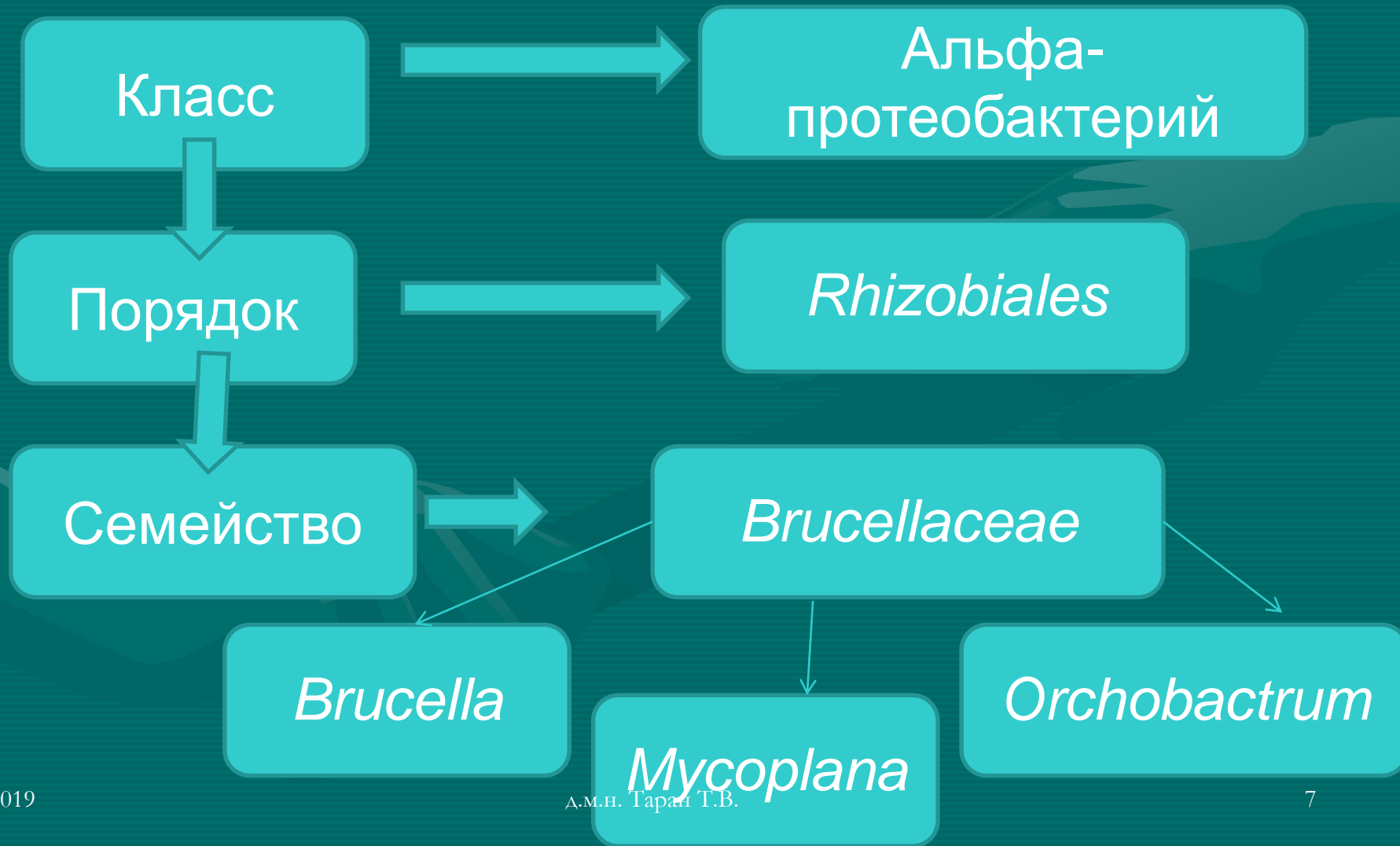
*B. canis*.

На основании анализа ДНК представителей рода представители были отнесены к одному единственному виду *B. melitensis* [1986]

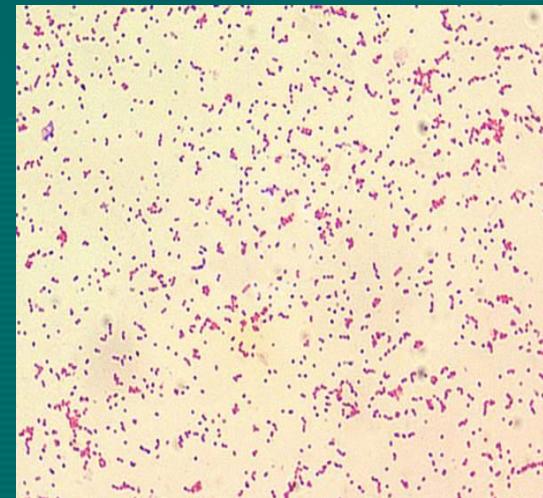
# Род *Brucella* [2008]

Вид	Биовары	Основной хозяин
<i>Brucella melitensis</i> [1893,1920]	1, 2, 3	Овцы, козы
<i>Brucella abortus</i> [1901, 1920]	1, 2, 3, 4, 5, 6, 9	Крупный рогатый скот
<i>Brucella suis</i> [1929]	1, 2, 3, 4, 5	Свиньи, кабаны, зайцы, северные олени, мышевидные грызуны
<i>Brucella ovis</i> [1956]		Бараны
<i>Brucella neotomae</i> [1956]		Пустынные кустарниковые крысы
<i>Brucella canis</i> [1968]		Собаки
<i>Brucella ceti</i> [2001, 2007]		Китообразные (морские свиньи, дельфины)
<i>Brucella pinnipedialis</i> [2007]		Ластоногие (тюлени)
<i>Brucella microti</i> [2008]		Полевка серая
<i>Brucella inopinata</i> [2009]		Инфекция импланта молочной железы

# Систематическое положение рода *Brucella*



- Микробные клетки бруцелл грамотрицательны, могут иметь шаровидную, овоидную или палочковидную формы, размеры клеток 0,3-0,6 мкм – для кокковых и 0,6-2,5 мкм – для палочковидных форм (в 1,67 раза мельче *E. coli*).
- В микроскопических препаратах микробные клетки располагаются чаще всего беспорядочно, иногда формируют цепочки, а в некоторых случаях встречаются клетки, расположенные попарно в виде диплококков.





Бруцеллы – факультативные анаэробы, культивирование культур вида *B. ovis* и первых генераций вида *B. abortus* возможно только в анаэробных условиях (5-10 % углекислого газа). Культуры других видов растут в обычных условиях.

Особенностью питательных потребностей обладают культуры вида *B. ovis*.

Для культивирования штаммов данного вида необходимы среды, в состав которых дополнительно вносится 10 % нормальной кроличьей сыворотки или аминокислоты.

- Максимальный рост бруцеллезного микроба при прочих благоприятных условиях наблюдается при рН – 6,6-7,4 (оптимум 7,2).
- Наилучшей температурой культивирования бруцелл является температурный диапазон от 34 до 37 °С (оптимум 37 °С).

# Для выделения и культивирования бруцелл используют:

- печеночные и мясопеченочные агары и бульоны,
- агар и бульон Альбими (дрожжевой гидролизат)
- агар Д (рыбный гидролизат)
- сывороточно-декстрозный агар,
- эритрит-агар,
- кровяной агар.

На минимальных средах установлено, что для культивирования бруцелл необходимо наличие следующих аминокислот:  $\alpha$ -аланин,  $\alpha$ -лизин,  $\alpha$ -гистидин,  $\alpha$ -метионин,  $\alpha$ -цистеин.

## Коммерческие отечественные среды:

- питательная среда для выделения бруцелл,
- эритрит-бульон и эритрит-агар.

## Среды зарубежного производства:

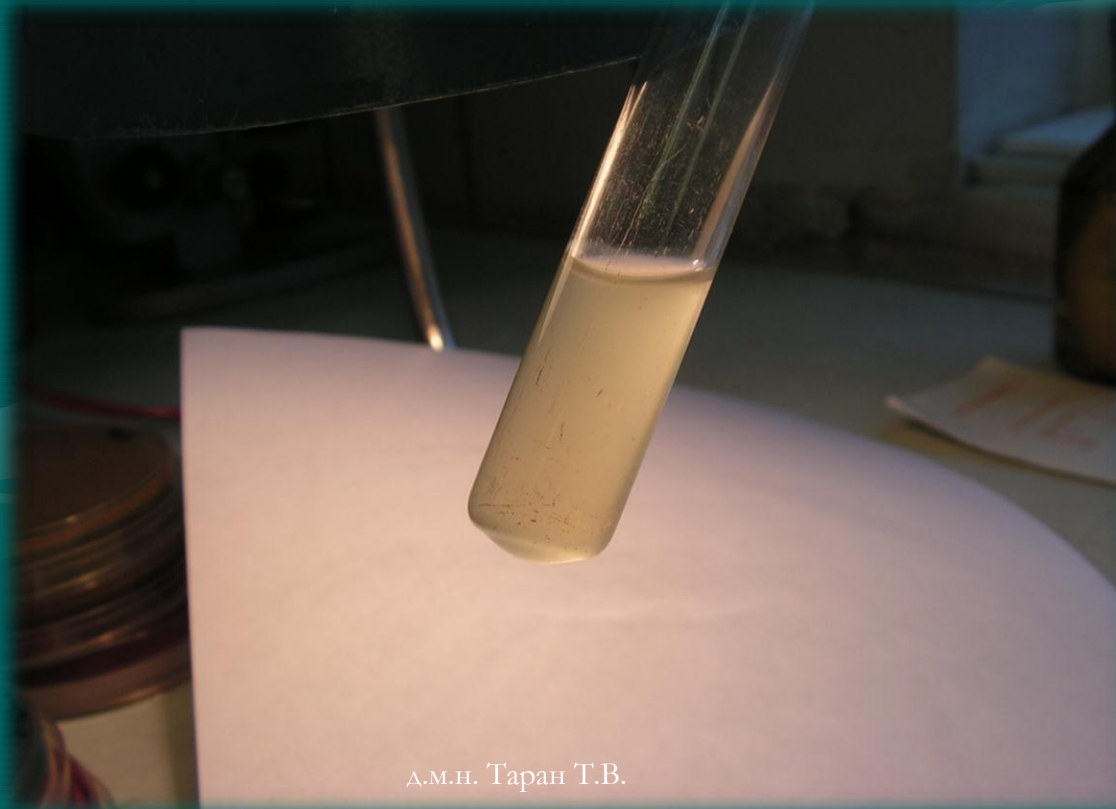
- Brucella agar base,
- Brucella broth base,
- Brucella vitamin K,
- Blood agar base (Himedia, Индия) и др.

На плотных питательных средах культура в S-форме формирует бесцветные, выпуклые колонии с гладкой поверхностью, которые прозрачны в проходящем свете, в отраженном – имеют янтарный оттенок.



С возрастом колонии постепенно мутнеют. Величина колоний различна: от относительно крупных (3-4 мм в диаметре) до точечных (0,05-0,1 мм).

- На жидких питательных средах бруцеллы дают равномерную муть.
- При длительном стоянии на поверхности жидкой среды образуется пленка.



Патогенными для человека являются бруцеллы, находящиеся в S-форме.

Для бруцелл характерно явление диссоциации (изменение исходных свойств культур), которое проявляется в различной степени выраженности (SR-, R-, RS-, M-колонии).

Восстановление исходного состояния культуры достигается путем ее пассажа на плотных питательных средах или через биопробных животных.

Бруцеллы видов *B. ovis* *B. canis* циркулируют в организме чувствительных животных в S-форме

# Характеристика генома

Анализ геномов 3-х патогенных видов бруцелл (*B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*) выявил высокую гомологию ДНК на нуклеотидном уровне (> 90 %).

Общий размер генома бруцелл составляет  $2,37 \times 10^3$  МДа, с содержанием ГЦ пар 58-59 моль %.



Геномы культур видов *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. ovis*, *B. neotomae* и *B. suis* 1 биовара представлен двумя хромосомами с размерами 2,1 Мб и 1,5 Мб.

Оба репликона определяют метаболические и репликативные функции и, следовательно, являются хромосомами, а не плазмидами .

Геномы культур вида *B. suis* 2 и 4 биоваров имеет две хромосомы размером 1,85 Мб и 1,35 Мб, а *B. suis* 3 биовара – всего одну 3,1 Мб.

# Антигенная структура

Первые сведения об антигенной структуре относятся к 1932 г., когда Wilson, Miles описали наличие у бруцелл двух антигенов А и М, которые проявляли видоспецифичность.

У бруцелл вида *B. melitensis* преобладал антиген М, у бруцелл видов *B. abortus* и *B. suis* – антиген А.

Как и другие грамотрицательные микроорганизмы бруцеллы содержат ЛПС, как основной компонент их наружной мембраны и важный фактор вирулентности. Морфология колоний, (S-, R-) зависит от структуры ЛПС.

Гладкий фенотип формируется благодаря присутствию полного ЛПС, который состоит из липида А, корового олигосахарида и O-боковых цепей полисахарида.

ЛПС шероховатых штаммов не содержит боковые O-цепи.

В настоящее время у бруцелл описаны также:

- два полисахара (чистый гаптен и В полисахарид)
- минимум 20 белковых или гликопротеиновых антигенов

ЛПС антигены являются поверхностными антигенами, в то время как большинство белковых антигенов обнаруживается в some микробной клетки.

# Биохимическая активность

- Каталазы
- Уреазы
- Гиалуронидазы
- Липазы и амилазы
- Адениндезаминазы
- Низкая сахаролитическая активность



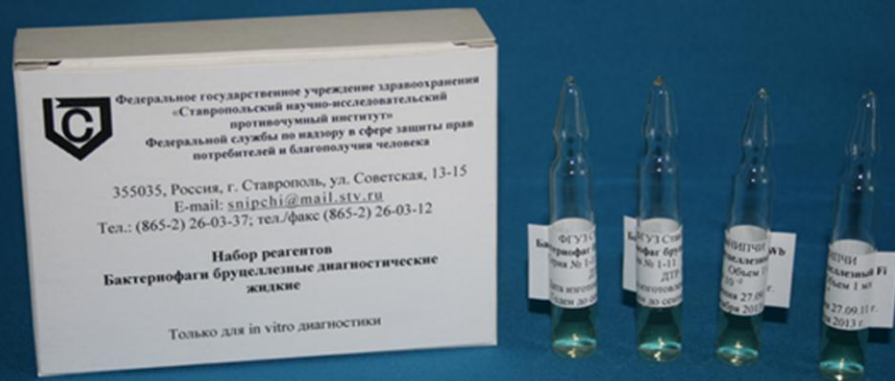
# Сравнительная биохимическая активность представителей рода *Brucella*

Вид бруцелл	Уреаза	Каталаза	Аденин-дезаминаза	Сахаролитическая активность						
				Эритритол	Глюкоза	Инозит	Манноза	Рамноза	Мальтоза	Трегалоза
<i>B. melitensis</i>	—	+	—	+	+	—	—	—	—	—
<i>B. abortus</i>	±	±	—	+	+	+	+	+	—	—
<i>B. suis</i>	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+

# Бактериофаги бруцелл

- Тб (Тбилиси) – 1956 г. Попхадзе и Абашидзе
- Wb (Weybridge)
- Fi (Firenze),
- Bk (Berkley)
- R-фагом (R/O, R/C)
- Iz (Izatnagar)

Бактериофаги содержат не менее  $1 \times 10^8$  фаговых частиц в 1мл.  
Диагностический титр разведения бактериофагов не менее  $10^{-2}$



# Бактериоциногенность

Бактериоциногенность – это способность бактерий синтезировать белковоподобные антибактериальные вещества с ограниченным диапазоном активности.

Продукция бруцеллацина является стабильным признаком, в случае его угасания может восстановиться путем пассирования культуры через биопробных животных или пересевах на питательных средах.

Выражена у культур вида *B. ovis*



# Факторы патогенности

- гиалуронидаза
- S-ЛПС
- продукция аденина и гуанина монофосфатов, которые ингибируют функцию фагоцитов;
- Cu-Zn пергидроль дисмутаза, которая считается ответственной за кислород опосредованный фагоцитоз;
- стресс-индуцированные протеины, которые активизируют выживание микробных клеток бруцелл внутри макрофагов.

Наиболее вирулентным для человека и животных является культура вида *B. melitensis*. Штаммы данного вида способны вызывать заболевание при введении единичных микробных клеток, так для морских свинок это доза составляет 20 м.к. Инфицирующая доза (ИД<sub>50</sub>) *B. melitensis* для обезьян при подкожном введении не достигает 100 м.к., а для *B. suis* при введении в форме аэрозоля морским свинкам составляет 36 м.к. Общая смертность при бруцеллезе не достигает 2 %.

# Лабораторная диагностика бруцеллеза

# Методы, позволяющие выявить бруцеллы и их растворимые антигены

- Бактериологический
- Биологический
- Иммунофлуоресцентный
- Реакция нейтрализации антител (РНАт)
- Иммуноферментный анализ (ИФА)
- Полимеразная цепная реакция (ПЦР)
- Иммунорадиометрический анализ (ИРМА)
- Реакция двойной диффузии в геле (РДГА)
- Иммуноблотинг

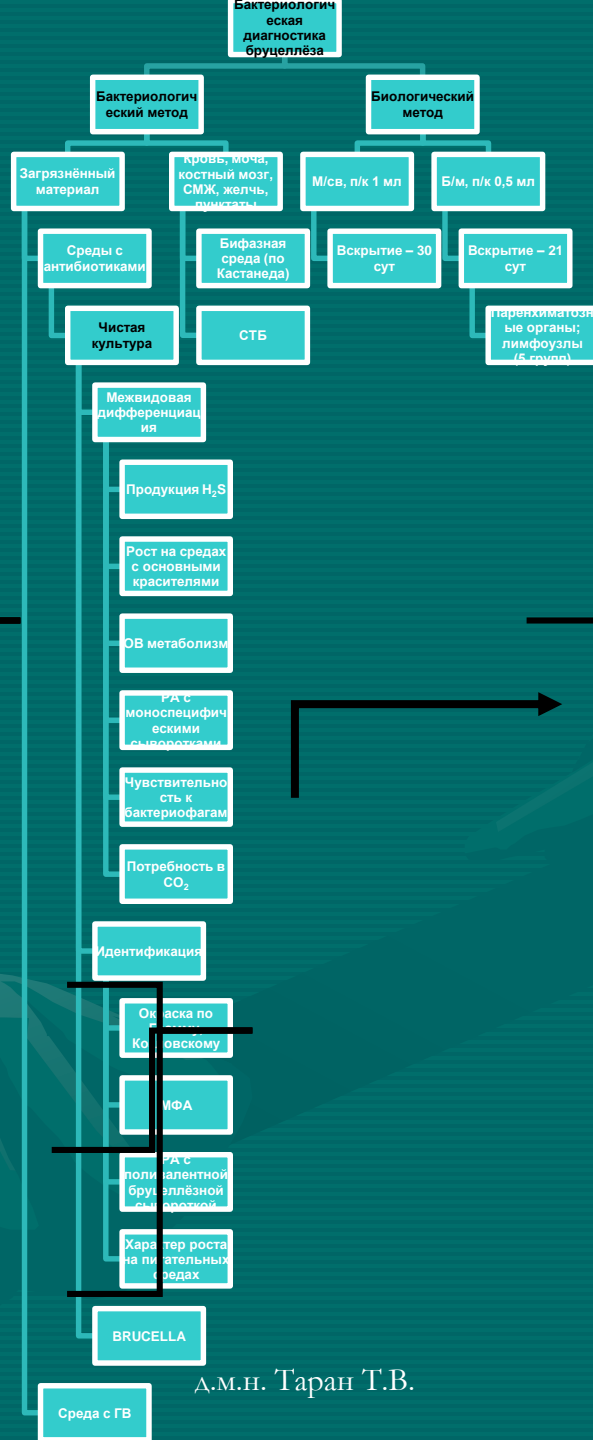
# Специфическая индикация возбудителя бруцеллёза

Для быстрого обнаружения возбудителя бруцеллеза пищевых продуктах, воде и патологическом материале рекомендуются:

- микроскопия препаратов окрашенных по Граму или Козловскому,
- МФА,
- ИФА,
- ПЦР,
- РНАт

# Материал для исследования на бруцеллез:

- от людей: кровь, костный мозг, спинномозговая жидкость, моча, желчь, суставная жидкость (при артритах), гной (при абсцессах), секционный материал
- от животных: кровь, абортированные плоды, околоплодные оболочки или желудок плода с его содержимым, лимфатические узлы, влагалищные выделения, молоко;
- пищевые продукты: сливки, сыры, творог, мясо
- объекты внешней среды: вода, почва, навоз



Выделение культуры бруцелл с помощью бактериологического метода осуществляют методом Кастанеда – посев крови одновременно на плотную и жидкую питательные среды.

Для посева крови и транспортирования материала предложена среда питательная жидкая для транспортирования биоматериала и накопления бруцелл.





# Тесты родовой идентификации бруцелл

- изучение морфологии колоний (диаметр 3-4 мм) и характера роста на плотных и в жидких питательных средах
- микроскопия окрашенных препаратов по Граму (грамотрицательны) или Козловскому (красные - сафранин)
- проба со специфической бруцеллезной агглютинирующей сывороткой (1:25) в РА на стекле
- МФА (свечение на 3-4 креста, 2-3 клетки в каждом поле зрения)

# Пробы для выявления S-культур бруцелл

- проба с трипафлавином (солевым раствором трипафлавина 1:500)
- реакция термопреципитации (прогревание взвеси концентрацией 1 млрд м.к./мл на водяной бане при температуре 90 гр. С в течение 30 мин; наблюдение через 30, 60 мин и 24 ч инкубации взвеси при комнатной температуре)
- проба Уайт-Вильсона (раствор кристаллвиолета 1:2000)

# Референтные штаммы бруцелл, применяемые при межвидовой дифференциации

- *B. melitensis* 16-М (1 биовар)
- *B. abortus* 544 (1 биовар)
- *B. suis* 1330 (1 биовар)

# Тесты межвидовой дифференциации бруцелл

- отношение культур к повышенному содержанию в атмосфере углекислого газа
- образование сероводорода
- редуцирующая активность в отношении основных красителей (фуксин и тионин)
- агглютинация моноспецифическими сыворотками
- лизис бруцеллезным бактериофагом Тб

# Потребность бруцелл к повышенному содержанию в атмосфере углекислого газа

<i>B. melitensis</i>	нет
<i>B. abortus</i>	да
<i>B. suis</i>	нет

# Продукция бруцеллами сероводорода

<i>B. melitensis</i> (1 биовар)	нет
<i>B. abortus</i> (1 биовар)	5-7 мм
<i>B. suis</i> (1 биовар)	15-20 мм

# Редуцирующая активность бруцелл в отношении основных красителей

	Тионин (20 мкг/мл)	Фуксин (20 мкг/мл)
<i>B. melitensis</i> (1 биовар)	Есть	Есть
<i>B. abortus</i> (1 биовар)	Нет	Есть
<i>B. suis</i> (1 биовар)	Есть	Нет



# РА бруцелл с моноспецифическими сыворотками

	сыворотка anti-abortus	сыворотка anti-melitensis
<i>B. melitensis</i> (1 биовар)	отрицательная	1:20 ( не менее, чем на 2 креста)
<i>B. abortus</i> (1 биовар)	1:20 ( не менее, чем на 2 креста)	отрицательная
<i>B. suis</i> (1 биовар)	1:20 ( не менее, чем на 2 креста)	отрицательная



# Литическая активность бруцеллезных бактериофагов (в ДТР) в отношении бруцелл

	Тб (Тбилиси)	Wb (Weybridge)	Fi (Firenze)	Bk (Berkley)
<i>B. melitensis</i> (1 б/в)	—	—	—	+
<i>B. abortus</i> (1 б/в)	+	+	+	+
<i>B. suis</i> (1 б/в)	—	+	±	+

Обозначения: (+) - 100 % лизис культур данного вида  
 (+) - частичный лизис культур данного вида  
 (-) - отсутствие лизиса

При исследовании материала, контаминированного посторонней микрофлорой, к питательным средам добавляют ингибиторы - генцианвиолет (из расчета 1:200000).

Комитет экспертов ФАО/ВОЗ по бруцеллезу рекомендует : полимиксин В – 6 мг/л, бацитрацин – 25 мг/л, амфотерицин В – 1 мг/л, циклогексимид – 100 мг/л, Д-циклосерин – 100 мг/л, налидиксовая кислота – 5 мг/л, ванкомицин – 20 мг/л

# Биологический метод

Биологические модели:

- белые мыши (генерализация инфекции 21 сут.)
- морское свинок (генерализация инфекции 30 сут.)

Посев:

- лимфоузлы (паховые, шейные, подчелюстные, аксиллярные, парааортальные)
- паренхиматозные органы (печень, селезенка)
- кровь, костный мозг

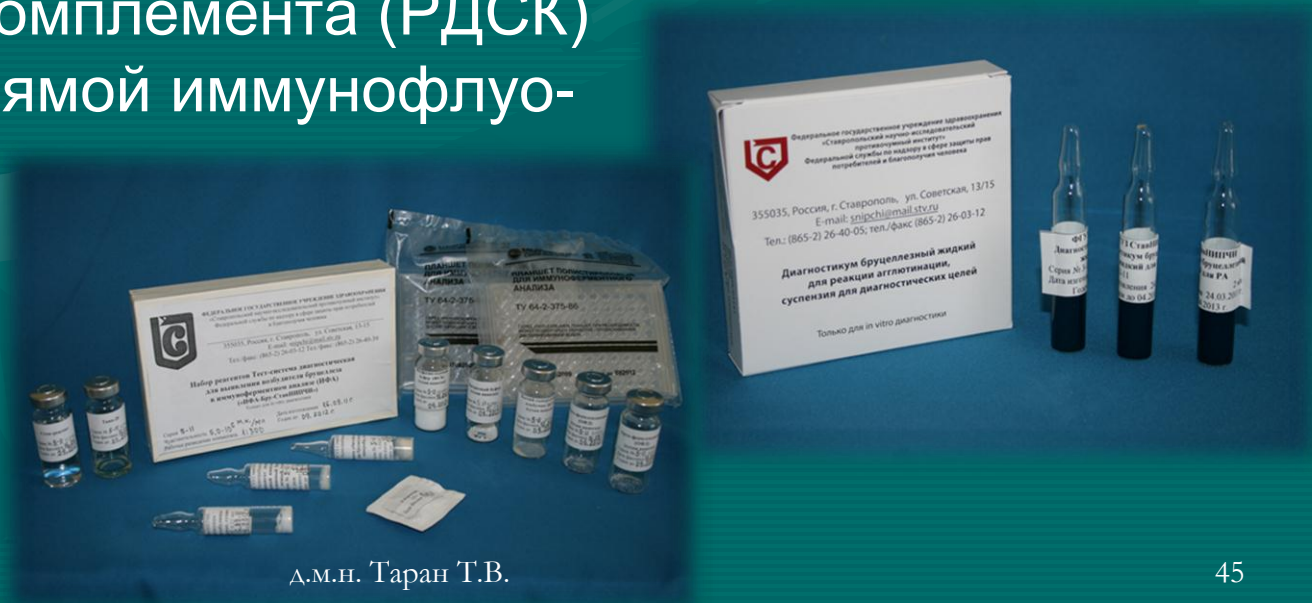
# Алгоритм диагностики при бруцеллезе:

Выделение культуры не является определяющим в постановке диагноза

Диагноз ставится на основании клинико-эпидемиологических данных, результатов иммуно-серологического исследования

# Тесты, выявляющие специфические антитела

1. Реакция агглютинации в пробирках (Райта)
2. Реакция агглютинации на стекле (Хеддльсона)
3. Реакция пассивной гемагглютинации (РПГА)
4. Антиглобулиновая проба Кумбса (РК)
5. Иммуноферментный анализ (ИФА)
6. Реакция связывания комплемента (РСК) и длительного связывания комплемента (РДСК)
7. Реакция непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ)



# Внутрикожная аллергическая проба Бюрне



Основана на способности организма, сенсibilизированного бруцеллезным антигеном, специфически ответить местной реакцией (отек, болезненность) на внутрикожное введение бруцеллина.

Бруцеллин представляет собой фильтрат трехнедельной бульонной культуры бруцелл.

Реакция специфична, но выявляется у больных позднее, чем антитела, и сохраняется очень долго, иногда годами, после исчезновения клинических СИМПТОМОВ.

Аллергическая реакция может быть положительной в случаях:

- бессимптомной инфекции
- у привитых живой бруцеллезной вакциной
- у лиц, длительно контактировавших со специфическим антигеном

- Бруцеллин вводят внутрикожно в количестве 0,1 мл. Инъекция делается на ладонной поверхности предплечья.
- Учет реакции производится через 24-48 ч. после введения бруцеллина путем осмотра и ощупывания кожи.
- В некоторых случаях аллергическая реакция становится положительной к 72 ч.



# Учет аллергологической пробы

Результат пробы	Критерий оценки
Слабо положительная	Слабо выраженный отек не более 3 см в диаметре
Положительная	Отек размером от 2 до 6 см в диаметре
Резко положительная	Отек свыше 6 см, иногда сопровождающаяся лимфаденитом и общей реакцией

- Отсутствие болезненности и гиперемии при наличии отека не исключает положительной оценки пробы.
- Гиперемия кожи при отсутствии отека принимается за отрицательный результат.

# Поэтапное развитие иммунологической реактивности у больных бруцеллезом

	10 сут	30 сут	60 сут	90 сут	120 сут	180 сут
РХ	+	+	+	+	+	+
РА	-	+	+	±	-	-
РПГА	±	+	+	+	+	+
РК	-	±	+	+	+	+
Проба Бюрне	-	+	+	+	+	+
ИФА	-	+	+	+	+	+

# Полимеразная цепная реакция

Преимуществом метода является возможность индикации и идентификации возбудителя бруцеллеза в течение короткого промежутка времени (4-6 ч.) и его высокая чувствительность ( $1 \times 10^2 - 10^3$  м.к. /мл).

Отсутствие перекрестных реакций с ДНК *E. coli*, *V. cholerae*, *F. tularensis*, *Y. enterocolitica* 09, *Y. pestis* EV, *S. typhimurium* обуславливает специфичность метода.

# ПЦР позволяют осуществлять выявление возбудителя бруцеллеза

- в пробах клинического материала (кровь, сыворотка крови, гистологический материал)
- в объектах окружающей среды (вода, почва, смывы)
- в пищевых продуктах (молоко, кисломолочные продукты).

# Подходы к использованию лабораторных методов исследования при бруцеллезе

Цель исследования	Посев крови	РХ	РА	РПГА	РК	ИФА	Проба Бюрне
Острый и подострый бруцеллез	+	+	+	+	если все тесты отриц, то +	+	
Перед вакцинацией		+				+	+
Эпидобследование		+	+	+	+		+
Хронический бруцеллез					+	+	+

# Бруцеллезные диагностические препараты и питательные среды:

1. Аллерген бруцеллезный жидкий (Бруцеллин), филиал ФГУП НПО «Микроген» г. Омск
2. ГенБру Тест-система для выявления ДНК *Brucella* spp. методом ПЦР (РосНИПЧИ «Микроб»);
3. Набор реагентов «АмплиСенс® *Brucella* spp FRTи FER» (ФБУН ЦНИИЭ, г. Москва);
4. Диагностикум бруцеллезный жидкий для РА (филиал «Медгамал», Ставропольский противочумный институт)
5. Иммуноглобулины флуоресцирующие (филиал «Медгамал»);
6. Сыворотка бруцеллезная диагностическая поливалентная для реакции агглютинации (Иркутский противочумный институт)

7. Эритрит-агар (филиал ФГУП НПО «Микроген»)
8. Бруцелла-агар, бруцелла-бульон (ГНЦ ПМБ, г. Оболенск)
9. Среда питательная жидкая для транспортирования биоматериала и накопления бруцелл (Ставропольский противочумный институт)
10. Набор реагентов. Бактериофаги бруцеллезные диагностические жидкие (Ставропольский противочумный институт)
11. Тест-система диагностическая для выявления возбудителя бруцеллеза в ИФА (ИФА-Бру-СтавНИПЧИ)
12. Набор реагентов. Сыворотки бруцеллезные диагностические моноспецифические anti-abortus и anti-melitensis жидкие (Ставропольский противочумный институт)



13. Набор реагентов. Тест-система для выявления антител к возбудителю бруцеллеза в иммуноферментном анализе (Ставропольский противочумный институт)
14. Наборы реагентов для выявления иммуноглобулинов классов М, к возбудителю бруцеллеза методом иммуноферментного анализа (Вектор Бест)
15. Наборы реагентов для выявления иммуноглобулинов классов G к возбудителю бруцеллеза методом иммуноферментного анализа (Вектор Бест)
16. Наборы реагентов для выявления иммуноглобулинов классов А к возбудителю бруцеллеза методом иммуноферментного анализа (Вектор Бест)

# СИБИРСКАЯ ЯЗВА



Сибирская язва (Anthrax) – острая зоонозная особо опасная бактериальная инфекция, протекающая в локализованной и генерализованной формах

Возбудитель сибирской язвы

*Bacillus anthracis*

*Anthrax* (лат., англ.)

*Charbon* (фр.)

*Milzbrand* (нем.)



# Систематическое положение *B. anthracis*

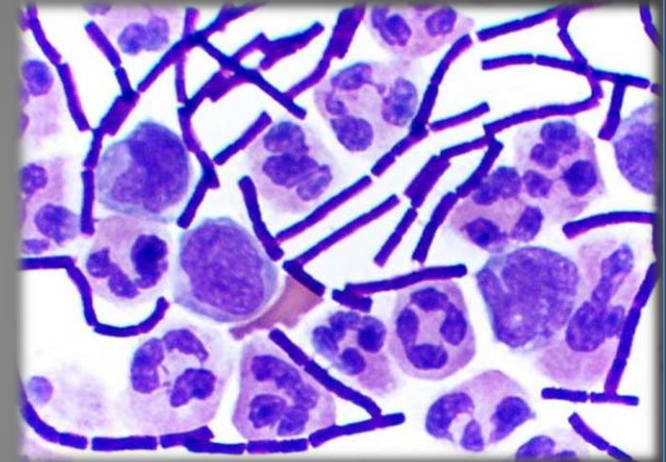
Тип - *Firmicutes*

Класс - *Bacilli*

Порядок - *Bacillales*

Семейство - *Bacillaceae*

Род – *Bacillus*



В роду *Bacillus* насчитывают 101 вид, выделяют группу видов *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycooides* и недавно признанный новый вид *B. weihenstephanensis*

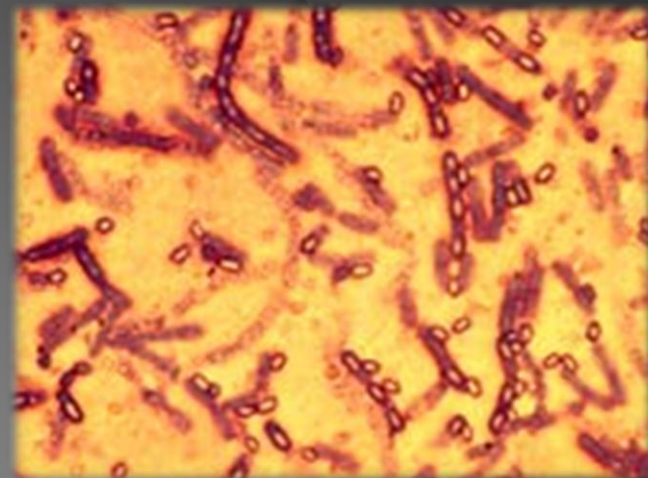
В зависимости от стадии развития культуры, а также условий окружающей среды, возбудитель сибирской язвы может существовать в трех формах:

- ✓ в виде бескапсульных вегетативных палочек (бацилл),
- ✓ инкапсулированных палочек
- ✓ спор.

Сибиреязвенный микроб — крупная неподвижная грамположительная палочка, хорошо окрашиваемая всеми анилиновыми красителями.

Размеры вегетативных клеток 1-1,5 x 6-10 мкм.

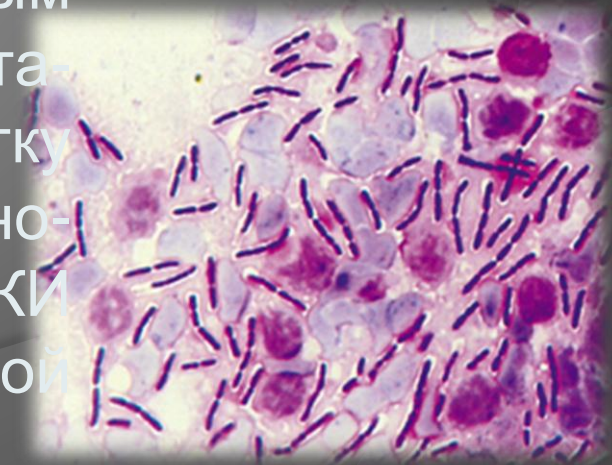
В мазках с питательных сред палочки образуют длинные цепочки, концы микробов в окрашенных препаратах обрублены или несколько вогнуты, цепочка напоминает бамбуковую трость с коленчатыми сочленениями.



# Капсулообразование



Типичные вирулентные штаммы микроба капсулу образуют только в живом организме или при культивировании в атмосфере с повышенным содержанием  $\text{CO}_2$  на специальных питательных средах, содержащих сыворотку и бикарбонат натрия [1% бикарбонатно-сывороточный агар, жидкая среда ГКИ (60% раствора Хэнкса и 40% лошадиной или бычьей сыворотки)].



## Для окраски капсулы используют специальные методы:

1. По методу *Ребигера* карболовым генцианвиолетом (клетки окрашены в синий цвет и окружены бесцветными или слабо розовыми капсулами)
2. По методу *Гинса* карболовым фуксином Циля на фоне черной туши (клетки окрашены в розово-малиновый цвет, капсулы бесцветны)
3. По методу *Бури* (негативное контрастирование прижизненного препарата, на темном фоне выявляются прозрачные неокрашенные зоны капсул вокруг микробных клеток)
4. Флуоресцирующими капсульно-соматическими иммуноглобулинами при люминесцентной микроскопии (вокруг темной клетки светящаяся ярко-зеленая капсула)



# Спорообразование

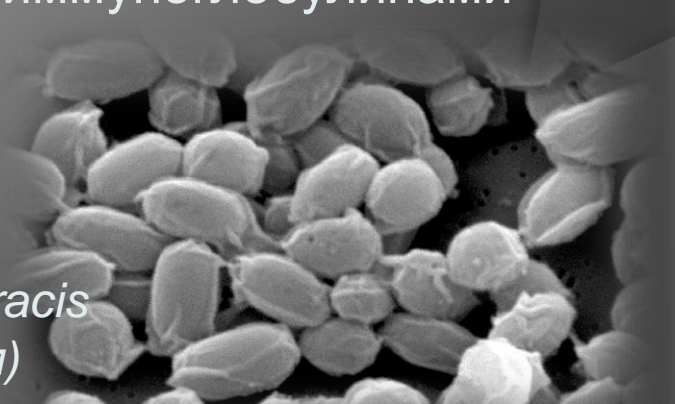
При неблагоприятных условиях микроб способен формировать споры. В каждой вегетативной клетке образуется только одна спора. Форма спор овальная, расположение центральное, диаметр споры не превышает поперечника микробной клетки. Спорообразование происходит вне живого организма, в условиях внешней среды или на питательных средах при свободном доступе кислорода, дефиците питательных веществ, определенной влажности, нейтральной или слабощелочной среде, при температуре 26-37 °С. При температуре выше 43 °С и ниже 12 °С спорообразование прекращается.

## Окрашивание спор

1. Окрашка карболовым фуксином по Циллю-Нильсену - зрелые споры окрашиваются в розовый цвет.
2. Окрашка споровыми флуоресцирующими иммуноглобулинами

Прорастающая спора *B.anthraxis*  
(электронная микроскопия)

Покоящиеся споры *B. anthracis*  
(электронная микроскопия)



# Антигенная структура

**Капсульный антиген** - составляет основную массу капсульного вещества, состоит из d-глутаминовой кислоты, синтез кодирует плазида рХО2, отличается слабыми иммуногенными свойствами.

**Соматический антиген** - входит в состав клеточной стенки, термостабильный, не разрушается при кипячении, используется при постановке реакции термопреципитации по Асколи, с помощью которой его выявляют в различных материалах животного происхождения (трупях, коже, шерсти животных).

# Антигенная структура

У возбудителя определяют два белковых экзотоксина – **отечного** и **летального**, которые формируются из трех компонентов: **протективного антигена (ПА)**, **отечного фактора (ОФ)** и **летального фактора (ЛФ)**. Все они кодируются плазмидой рХО1.

Эти белковые факторы не являются самостоятельными токсинами, и только комплексы отечного и летального факторов с протективным антигеном образуют соответствующие токсины с присущей каждому из них специфической биологической активностью.

В токсинном бинарном комплексе *B. anthracis* роль субъединицы В выполняет ПА, а А-субъединицами выступают ОФ и ЛФ.

ПА обеспечивает формирование специфического противосибиреязвенного иммунитета и является основой химических вакцин.

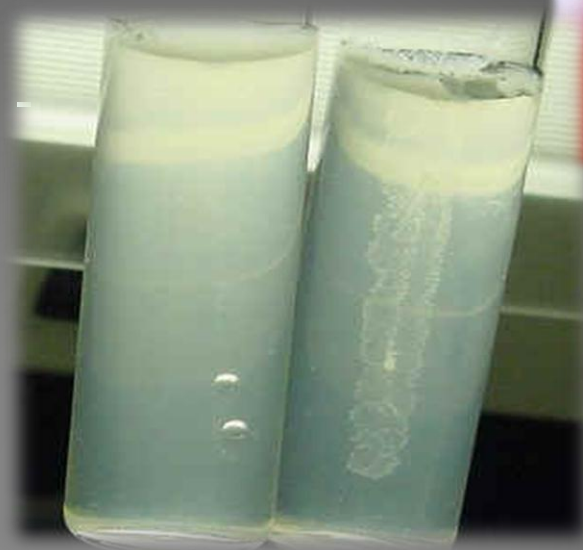
# Культурально-биохимические свойства

Возбудитель сибирской язвы – аэроб или факультативный анаэроб. Хорошо размножается на простых питательных средах.

Оптимальная температура роста 34-37 °С, оптимальное значение pH - 7,2-7,5.

Минимальные питательные потребности сибиреязвенного микроба удовлетворяются 5-10 аминокислотами и тиаминном.

Сибиреязвенный микроб неподвижен, в отличие от многих близкородственных бацилл.



А



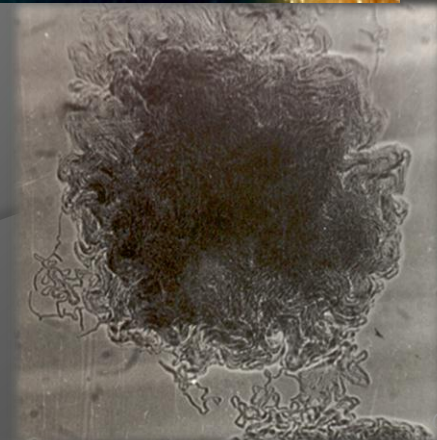
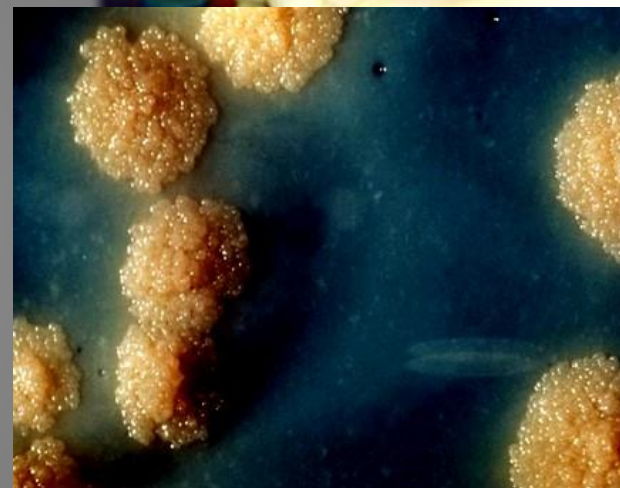
Б

А – *B. anthracis*; Б – *B. cereus*

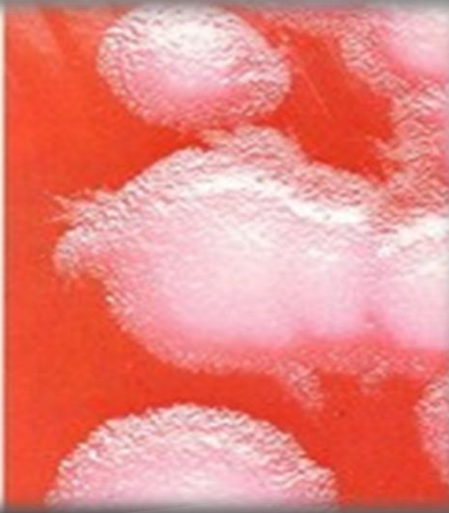
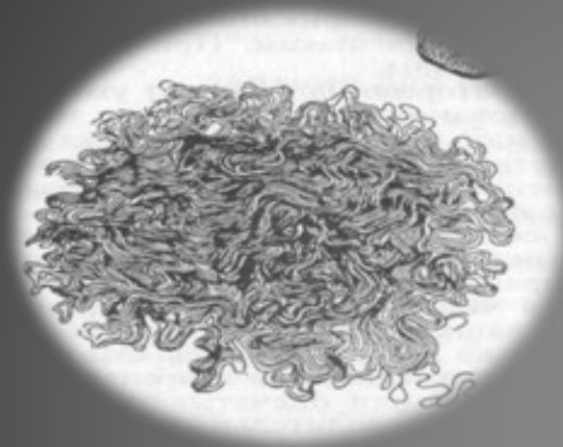
При росте на кровяном агаре с 3-5 % дефибрированной крови барана гемолиз не вызывает, в то время как большинство сапрофитов дают быстрый гемолиз (через 12-18 ч. при 37 °С).

## Морфология колоний *B. anthracis* на плотных питательных средах

На обычных плотных питательных средах (агар Хоттингера, МПА) после суточной инкубации при 35-37 °С образует крупные шероховатые матовые колонии в R-форме, с «шагреновой» поверхностью, с неровными краями и отходящими от них волнистыми отростками, напоминающими при просмотре в микроскопе (малое увеличение) локоны волос или «львиную гриву».



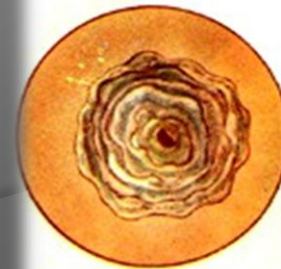
# Колоний *B. anthracis*



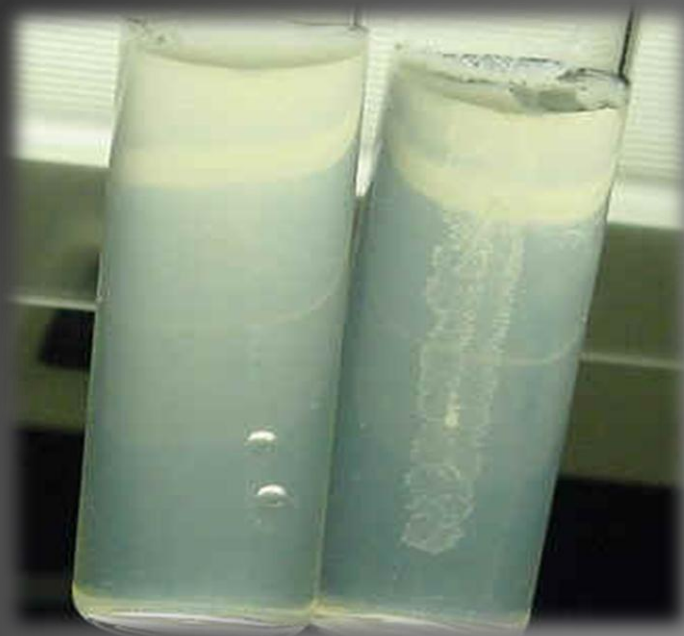
a



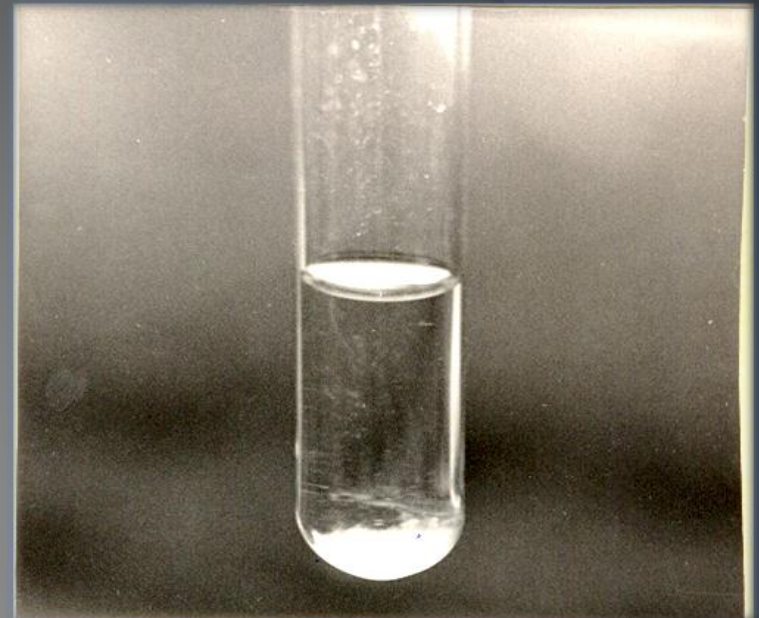
б



в



Обладает относительно низкой протеолитической активностью и при посеве уколом в столбик 10-12 % мясопептонного желатина и выращивании при 22 °С рост микроба напоминает елочку, опрокинутую верхушкой вниз; на 3-5 день желатин разжижается в виде воронки.



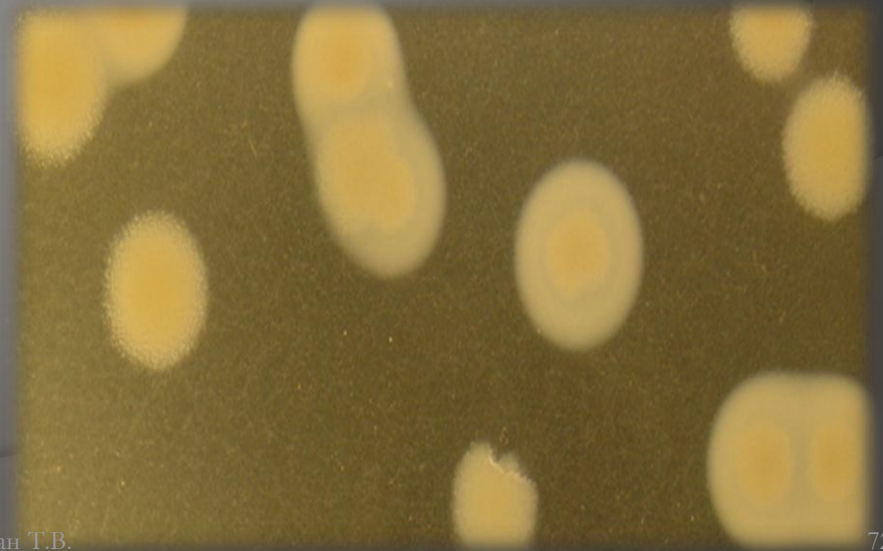
На МПБ или бульоне Хоттингера микроб растет в виде «комочка ваты», трудно разбивающейся при встряхивании, при этом бульон остается прозрачным

# Культурально-биохимические свойства

В основной массе не обладает лецитиназной активностью с отличием от сапрофитов. При росте на агаре с куриным желтком вокруг колоний не происходит помутнения среды в виде беловатой зоны, а при посеве на жидкую желточную среду желток не свертывается даже при 5-6-суточном инкубировании. Сапрофиты свертывают желток в течение 6-10 ч.

Однако некоторые вирулентные штаммы продуцируют лецитиназу.

Обладает в отличие от сапрофитных бацилл, низкой фосфатазной активностью и не способен разлагать фосфаты, добавляемые в питательную среду (тест на фосфатазу).

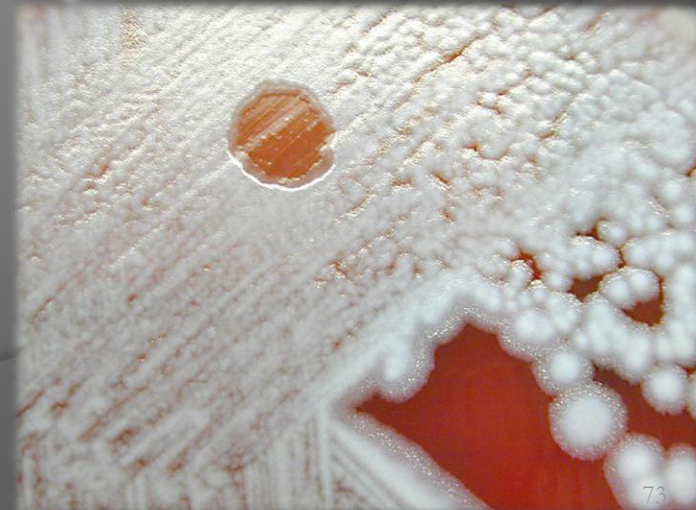
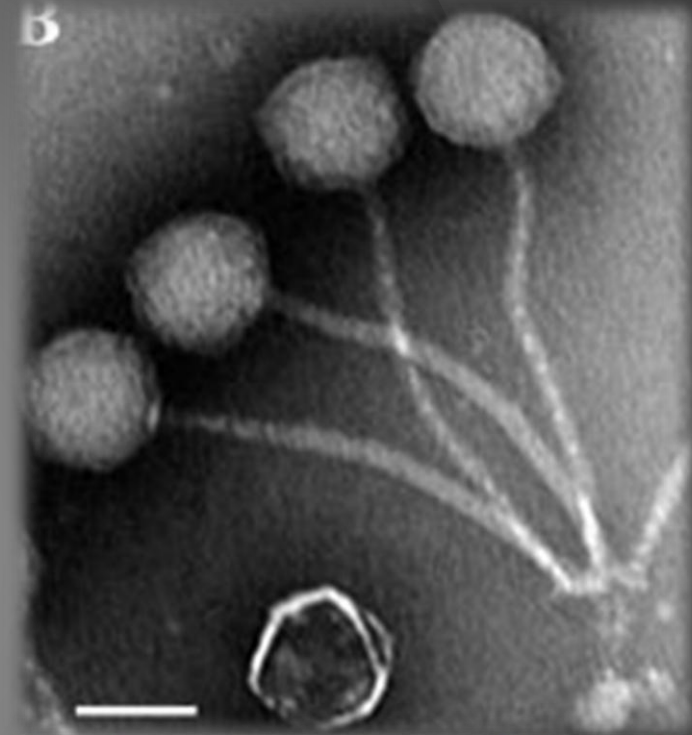




# Бактериофаги сибирязвенного микроба

Фаг Гамма ( $\gamma$ ) был выделен Brown и Cherry в 1955 г. как вариант фага W, образовавшийся после повторного инфицирования штамма *B. cereus* лизатом фага W.

Обладал уникальной способностью инфицировать как капсульные, так и бескапсульные штаммы. Наибольшее применение для идентификации штаммов *B. anthracis* нашли сибирязвенные бактериофаги «К ВИЭВ», «Гамма А-26», «ВА-9» и др.



# Патогенность

Обладает почти универсальной патогенностью для млекопитающих. Наиболее восприимчивы к нему травоядные домашние и дикие животные, более устойчивы свиньи и хищники. Обычные жертвы сибирской язвы – козы, овцы, КРС, лошади, ослы.

В дикой природе наблюдаются разлитые эпизоотии среди антилоп, оленей, жирафов, зебр, носорогов, слонов, буйволов, бизонов, описаны заболевания норок на фермах. Иногда болеют даже страусы.

Все приматы чувствительны к сибирской язве и близки по восприимчивости к человеку.

Заражающая доза для человека составляет 10 спор при подкожном заражении, около 20000 спор - при ингаляционном и  $1,25 \times 10^7$  спор - при пероральном.

Важнейшими факторами патогенности являются капсула и экзотоксины. Сибиреязвенный микроб образует их в инфицированном макроорганизме или при культивировании на искусственных питательных средах в специальных условиях.

Наличие **капсулы** необходимо на первых этапах инфекционного процесса для предотвращения опсонизации и фагоцитирования микроорганизма.

**Экзотоксин** играет ведущую роль в патогенезе сибиреязвенной инфекции и формировании специфического иммунитета. Сибиреязвенный экзотоксин относится к бинарным белковым токсинам АВ-типа и обладает двумя разными биологическими активностями.

Компонентами токсина являются ОФ, ПА и ЛФ - белки с молекулярными массами 89, 83 и 85 кДа. В настоящее время можно встретить сообщения о двух токсинах - отечном (ОФ+ПА) и летальном (ЛФ+ПА), в которых эффекторную функцию выполняют ОФ и ЛФ (А-субъединицы), а акцепторную и интернализирующую функции - ПА (В-субъединица).

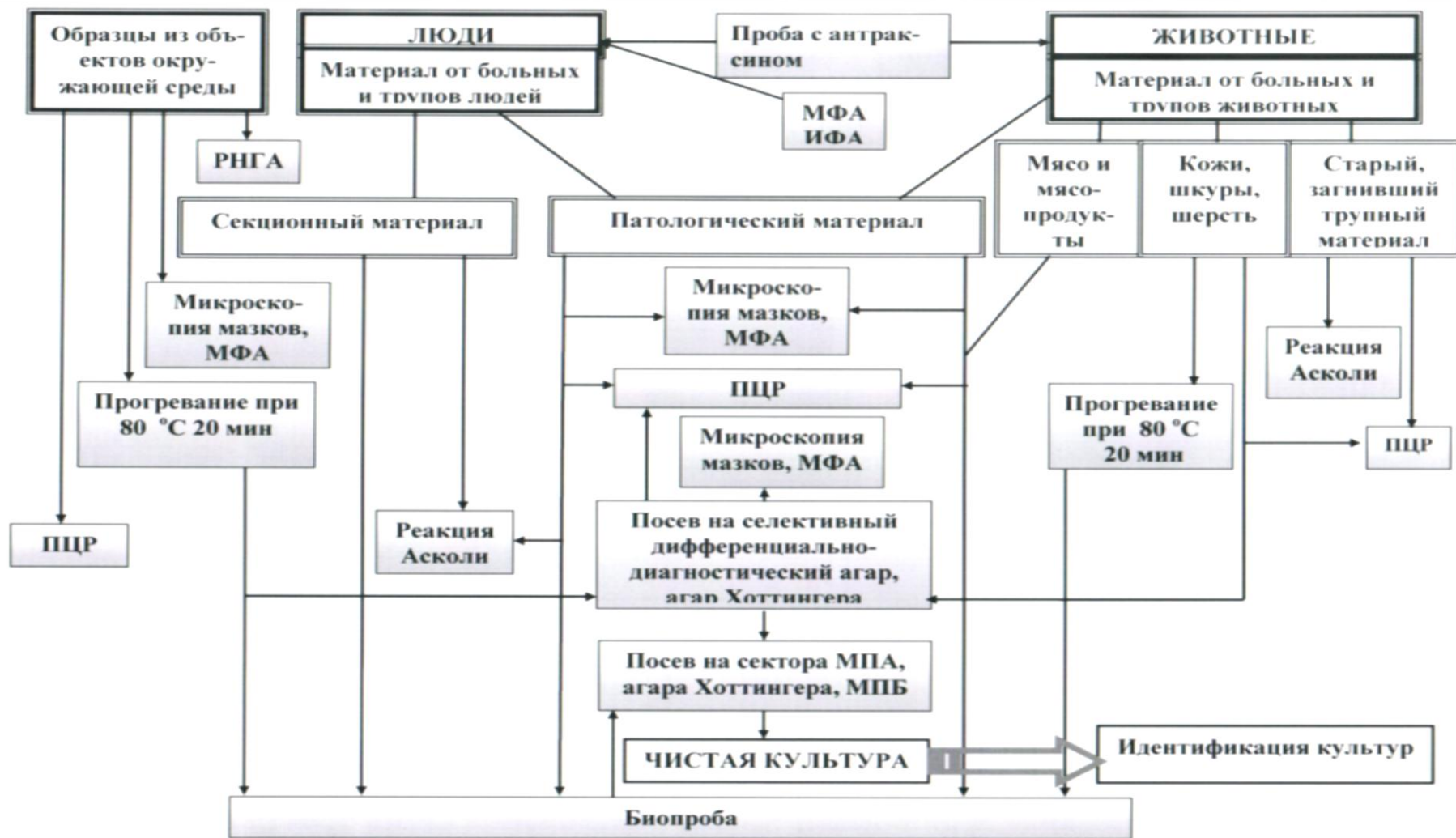
# Генетическая характеристика

Геном сибиреязвенного микроба представлен одной кольцевой хромосомой размером ~5,2-5,5 млн пар нуклеотидов и двумя плазмидами - рХО1 (~182 тыс. п.н.) и рХО2 (~94-96 тыс. п. н.).

Токсинообразование и капсулообразование детерминированы плазмидами рХО1 и рХО2.

Утрата одной или обеих плазмид приводит к авирулентности. В природе встречаются моно- и бесплазмидные варианты.

# Схема лабораторной диагностики



# Исследование на сибирскую язву включает:

- высевы на питательные среды
- микроскопию мазков из нативного материала
- постановку основных и дополнительных методов идентификации
- выявление специфических антигенов и антител
- постановку ПЦР
- проведение биопробы
- применение реакции преципитации

# ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Делится на два этапа:

1. Обнаружение возбудителя или его компонентов (ДНК, антигенов) в организме больных людей, животных, секционном материале или объектах окружающей среды.
2. Выделение и идентификации чистой культуры возбудителя с последующим изучением ее свойств

# Материал для исследования:

- от больных или подозрительных на заболевание людей – содержимое везикул, отделяемое карбункула или язвы, струпы, мокрота, кровь, спинномозговая жидкость, моча, испражнения, экссудаты
- трупный материал – кровь, экссудаты, кусочки органов (селезенки, печени, лимфоузлов и др.)
- материал от животных
- продовольственное сырье и продукты животного происхождения
- объекты окружающей среды – почва, трава, фураж, подстилка, вода и т.д.

Подготовленные для исследования пробы делятся на две части, одну из которых прогревают при 80 °С в течение 20 мин. Из непрогретой и прогретой частей материала проводят высеивание на плотные и жидкие питательные среды, заражают биопробных животных и проводят ПЦР-анализ.



Порядок забора, хранения, транспортирования и выполнения лабораторных исследований биологического материала от больных и умерших людей, животных с подозрением на сибирскую язву, а также материала из объектов окружающей среды, подозрительного на контаминацию возбудителем данного заболевания определяются методическими указаниями «Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы» (МУК 4.2.2413-08)

# Бактериоскопия

## Световая микроскопия

Из поступивших на исследование проб (от людей и животных) готовят несколько мазков. Окрашивают по Граму и на капсулу одним из методов.

Наиболее эффективна окраска капсулы методом Ребигера. Капсула окрашивается в розовый или красно-фиолетовый цвет, тело микробной клетки – в темно-фиолетовый.

Для обнаружения спор в образцах внешней среды после фиксации мазки окрашивают карболовым фуксином по Цилю-Нильсену

Споры, в зависимости от степени их жизнеспособности, могут окрашиваться следующим образом:

- розовые с более интенсивной окраской по периферии - жизнеспособные;
- равномерно окрашенные в красный цвет - слабо жизнеспособные;
- синие - нежизнеспособные.

По результатам микроскопического исследования немедленно дают предварительный ответ.

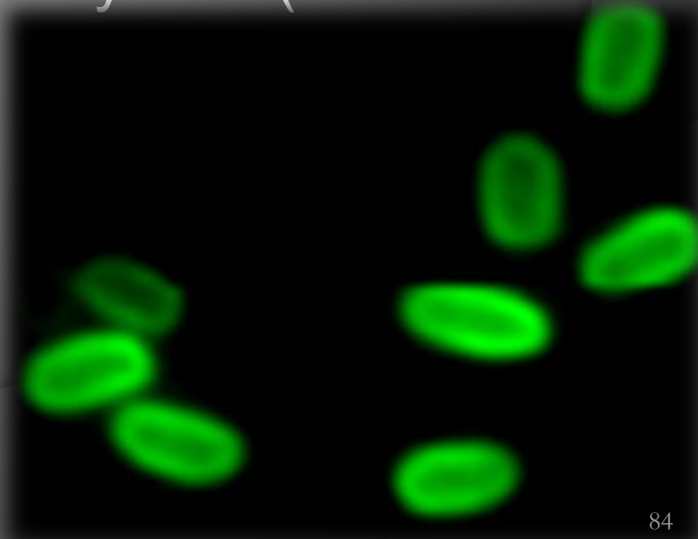
# Люминесцентная микроскопия

1. Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие сибиреязвенные вегетативные сухие (Ставропольский НИПЧИ)

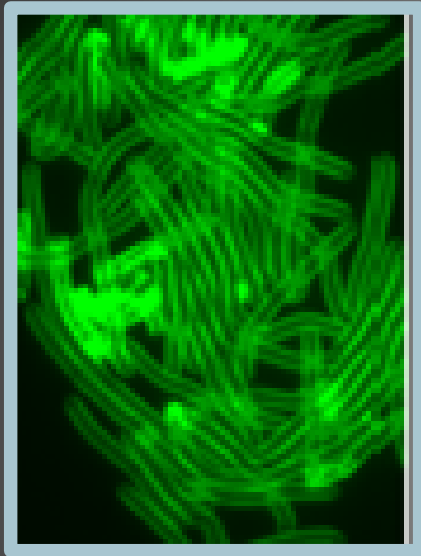
2. Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие сибиреязвенные споровые адсорбированные сухие (Ставропольский НИПЧИ)

3. Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие сибиреязвенные неадсорбированные сухие (НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи)

Споры *B. anthracis* – окраска иммуноглобулинами диагностическими флуоресцирующими сибиреязвенными споровыми

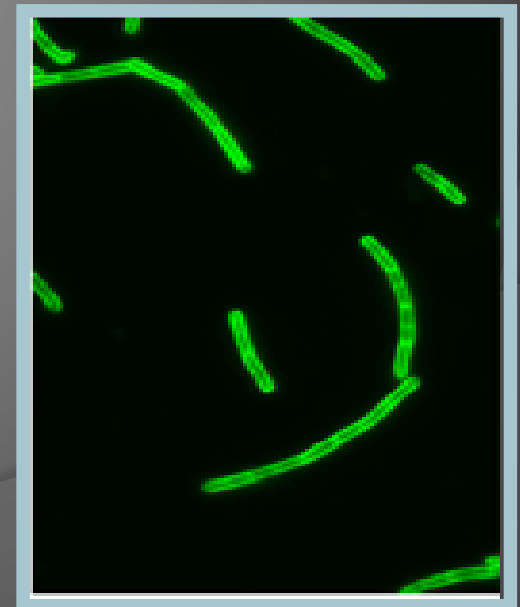


# Оценки результатов люминесцентной микроскопии



++++ – большое количество специфически светящихся клеток, очень яркая флуоресценция по периферии споры или вегетативной клетки, четко контрастирующая с темным телом клетки;

+++ – яркая флуоресценция периферии клеток, клетки расположены отдельными группами (цепочками) и единично;



# Бактериологический метод

Подготовленный материал засевают:

- на чашки Петри с МПА, агаром Хоттингера (рН 7,2-7,4),
- селективную дифференциально-диагностическую среду с фенолфталеином
- пробирку с МПБ.

Для посева одной пробы желательно использовать не менее 5 чашек.

При исследовании материала, слабо загрязненного посторонней микрофлорой (кровь, пунктаты из карбункула, органы биопробных животных) посев можно проводить петлей без истощения, используя при этом МПА, агар Хоттингера, кровяной агар и МПБ.

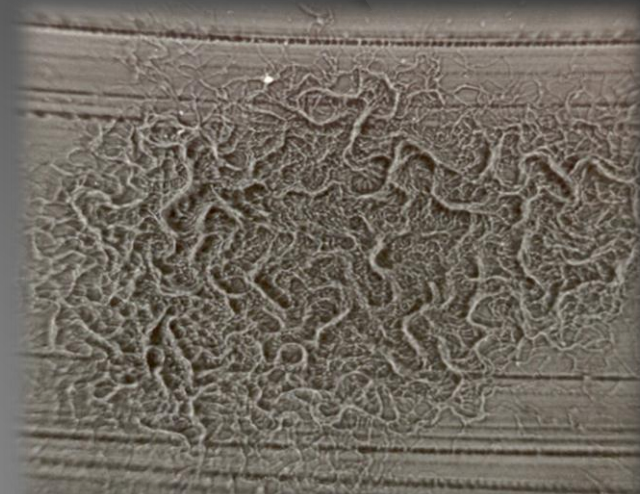
Посевы помещают в термостат при  $(36\pm 1)$  °С на 18-20 ч. и при отсутствии роста выдерживают при той же температуре 48 ч.

# Просмотр посевов на плотных питательных средах

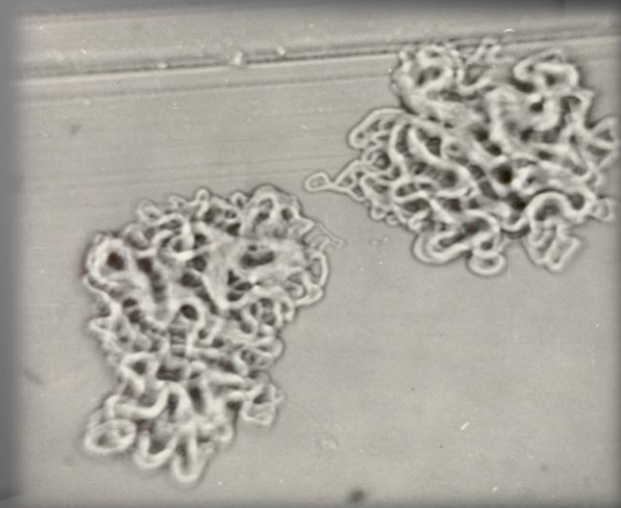
Кроме колоний сибиреязвенного микроба на средах может наблюдаться рост спорообразующих сапрофитов, морфологически трудно отличимых от *B. anthracis*.

Возбудитель сибирской язвы образует плоские матово-серые шероховатые колонии. Центр их иногда затемнен, периферия бахромчатая с локонообразными отростками. Встречаются колонии с менее выраженной шероховатостью и без отростков, которые также подлежат дальнейшей идентификации. Колонии *B. anthracis* трудно снимаются петлей с поверхности агара, в то время как колонии близкородственных сапрофитов снимаются легко.

Для выделения чистой культуры с питательного агара отбирают не менее 10 шероховатых колоний, при отсутствии такого количества – все шероховатые колонии.

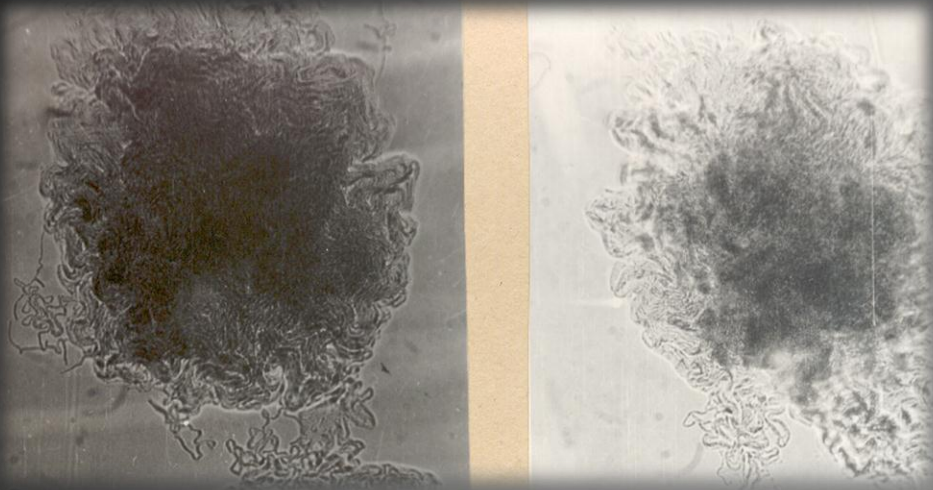


Начальный рост сибиреязвенного микроба через 3-4 ч.



Рост сибиреязвенного микроба через 8-12 ч.





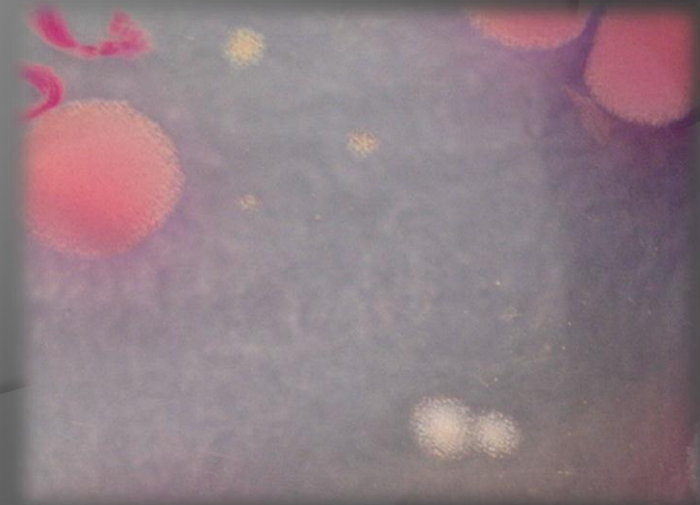
Формирование колоний  
сибирязвенного микроба на  
питательном агаре – через 16-  
18 часов

Формирование колоний  
сибирязвенного микроба на  
питательном агаре – через 48  
часа

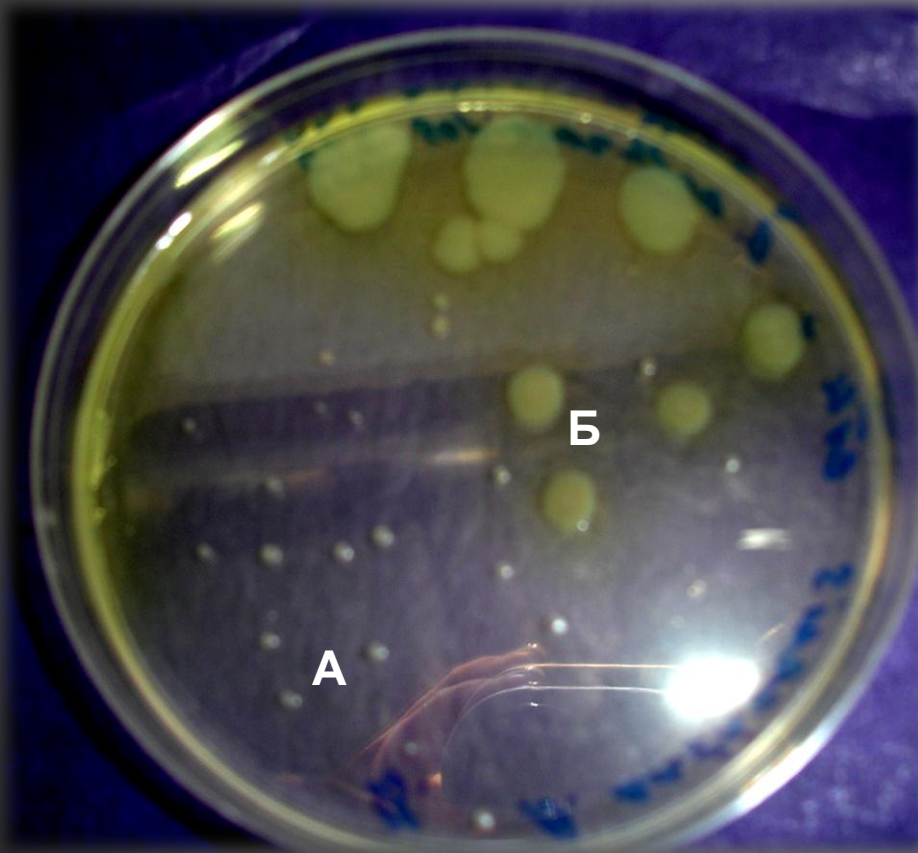


Посевы на селективной дифференциально-диагностической среде с фенолфталеинфосфатом натрия перед просмотром обрабатывают парами аммиака. Для этого в отдельную крышку от чашки Петри помещают фильтровальную бумагу и наливают на нее 1-2 мл аммиака водного (29 % концентрированного). Затем чашку с посевами (агаром вверх) помещают на несколько секунд (пока не порозовеют колонии сапрофитов) в крышку с аммиаком.

В силу того, что сибиреязвенный микроб не образует или продуцирует фосфатазу слабо, его колонии, как правило, не изменяют своего цвета. Колонии спорообразующих сапрофитов, в том числе и *B. cereus* приобретают розовый или красный цвет.



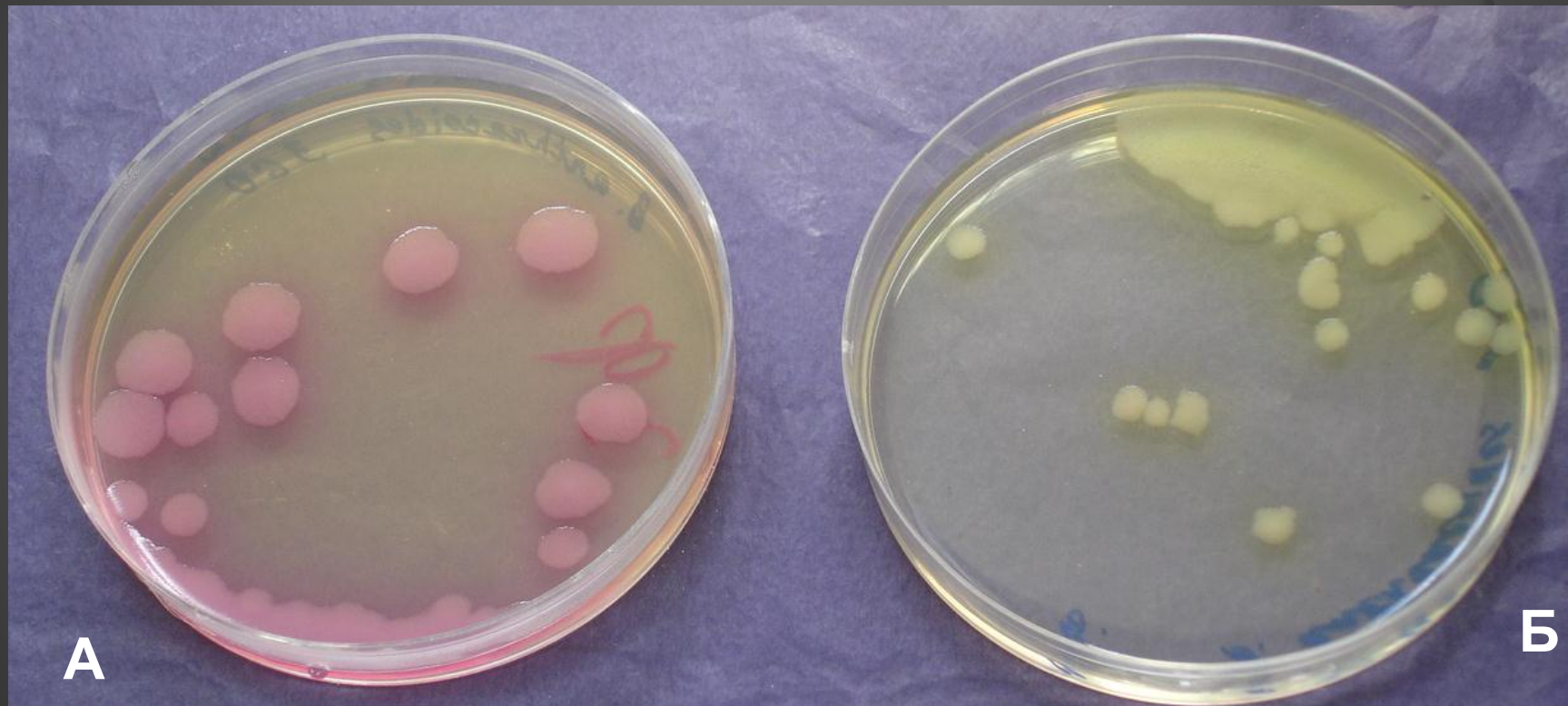
# Посев на селективную дифференциально-диагностическую среду с паранитрофенилфосфата динатриевой солью



А – колонии *B. anthracis*

Б – колонии *B. cereus*

# Вид колоний сапрофитов на селективных дифференциально-диагностических средах

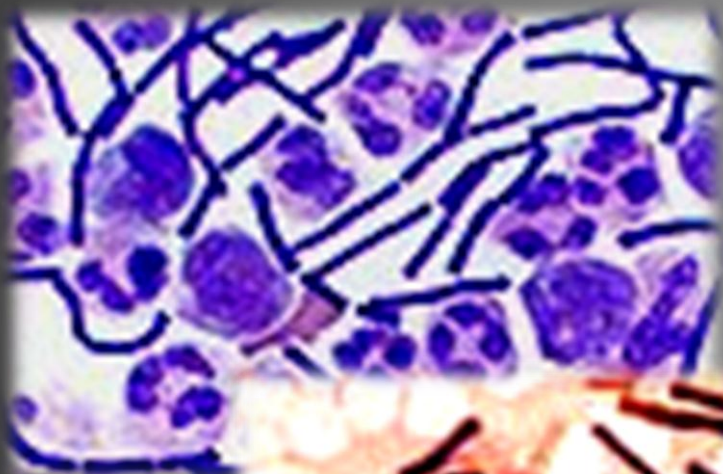


Субстраты:

А – фенолфталеинфосфат натрия;

Б – паранитрофенилфосфата динатриевая соль.

Из всех отобранных колоний делают мазки на двух или более предметных стеклах. Мазки фиксируют и окрашивают двумя способами – по Ребигеру (или по Граму) и сибиреязвенной флуоресцирующей соматической сывороткой.



# Биологический метод

- Для постановки биологической пробы используют белых беспородных мышей, морских свинок или золотистых хомяков.
- Материал суспендируют в 1-2 мл стерильного 0,9 % раствора NaCl и вводят подкожно во внутреннюю поверхность бедра 2 мышам в объеме 0,2-0,5 мл, 2 морским свинкам или 2 золотистым хомякам в объеме 0,5-1,0 мл.
- При вскрытии трупов биопробных животных, павших от сибирской язвы, отмечают характерный для сибиреязвенной инфекции студенистый геморрагический отек подкожной клетчатки на месте введения материала, гиперемию внутренних органов, увеличение селезенки и несвернувшуюся кровь.
- Из тканей и органов павших животных делают мазки-отпечатки, а так же производят посевы на МПА или агар Хоттингера и селективную среду.



# Иммунно-серологические методы исследования

## Реакция преципитации по Асколи

Реакция позволяет в короткие сроки обнаружить сибирязвенный антиген в экстрактах из струпьев язв больных, органов умерших от сибирской язвы людей, шкур и органов павших животных.

Для постановки реакции необходимы: преципитирующая сибирязвенная сыворотка, экстракт из исследуемого материала, сибирязвенный бактериальный антиген для контроля.

Реакция оценивается как положительная, если в пробирках с исследуемой пробой и с положительным контролем не позднее 15 мин. на границе раздела жидкостей появляется мутно-белое кольцо преципитации при его отсутствии в обоих отрицательных контролях.

# Иммунно-серологические методы исследования

- нМФА для выявления специфических антител в сыворотке крови. Используется сыворотка диагностическая антивидовая против иммуноглобулинов человека люминесцирующая. В нМФА диагностическими считаются титры – 1:16-1:32 и 4-кратное нарастание титров при повторном исследовании. Специфические антитела могут появляться с 5 суток и нарастать до 21 суток.
- Используется диагностикум эритроцитарный сибирезвенный иммуноглобулиновый сухой (НИИМ МО РФ, Киров). Исследование материала проводится согласно инструкции по применению.



# Молекулярно-генетические методы исследования

- Для проведения ПЦР с целью специфической индикации или идентификации *B. anthracis* используют тест-системы для выявления ДНК *B. anthracis*, разрешенные к применению в установленном порядке, позволяющие проводить учет результатов методами электрофореза в агарозном геле или методом ПЦР в режиме реального времени либо с флуоресцентной детекцией по «конечной точке».



- «ГенСиб». Тест-система для выявления ДНК *B. anthracis* *pXO1* методом ПЦР (РосНИПЧИ «Микроб», г. Саратов)
- "АмплиСенс® *Bacillus anthracis*-FRT" (ИЛС)

# Кожно-аллергическая проба с сибиреязвенным аллергеном антраксином

Организм больного, переболевшего сибирской язвой и иммунизированного против этой инфекции, обладает свойством отвечать аллергической реакцией в виде гиперемии и инфильтрации кожи на месте введения сибиреязвенного аллергена – антраксина. Эта реакция может появляться уже с первых дней и наблюдается у подавляющего числа больных с конца первой недели заболевания. Аллергическая перестройка организма может сохраняться длительное время, что позволяет использовать пробу с антраксином не только для диагноза текущего заболевания, но и для ретроспективной диагностики.

Антраксин вводят внутрикожно в количестве 0,1 мл в нижней трети левого предплечья на внутренней стороне. В месте введения антраксина через 24-48 ч учитывается наличие гиперемии и инфильтрата.

# Кожно-аллергическая проба с сибирезвенным аллергеном антраксином

Элементы местной реакции через:		Оценка реакции
24 ч	48 ч	
Инфильтрат отсутствует, гиперемия возможна	Реакции нет	Отрицательная (-)
Гиперемия до 8 мм в диаметре с инфильтратом	Гиперемия менее 8 мм в диаметре	Сомнительная (±)
Гиперемия до 8-15 мм в диаметре с инфильтратом	Гиперемия 8 мм в диаметре и более	Слабоположительная (+)
Гиперемия до 16-25 мм в диаметре с инфильтратом	Гиперемия 8 мм в диаметре и более	Положительная (++)
Гиперемия до 26-40 мм в диаметре с инфильтратом	Гиперемия 8 мм в диаметре и более	Резко положительная (+++)
Гиперемия более 40 мм в диаметре с инфильтратом	Гиперемия 8 мм в диаметре и более	Очень резко положительная (++++)

# Тесты идентификации возбудителя сибирской ЯЗВЫ

## ИССЛЕДУЕМАЯ КУЛЬТУРА

### Основные методы идентификации

1. Морфология клеток в мазках.
2. Морфология колоний на плотной питательной среде и характер роста в бульоне
3. Спорообразование
4. Тест на подвижность
5. Тест с бактериофагом .
6. Тест на гемолиз на кровяном агаре
7. Тест на капсулообразование *in vitro*
8. Тест на патогенность для белых мышей и морских свинок (биопроба, тест на капсулообразование *in vivo*)
9. Тесты на чувствительность к пенициллину
10. Тест на щелочную фосфатазу

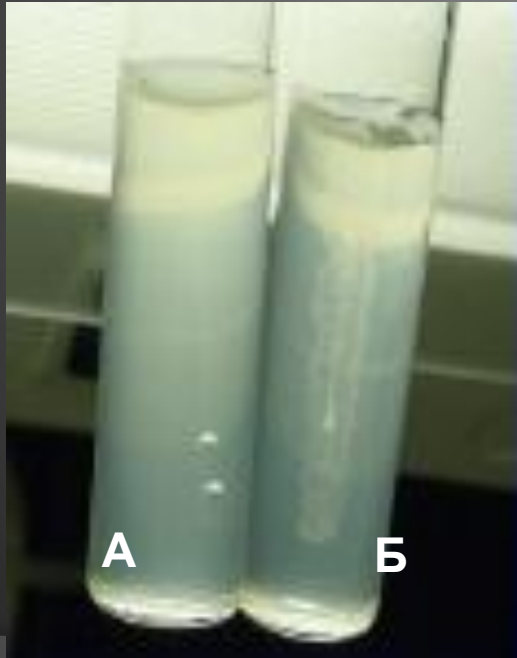
### Дополнительные методы изучения культур

1. Определение чувствительности к антибиотикам
2. Определения протеолитической активности
3. Тест на лецитиназу
4. Определение способности к росту на минимальной питательной среде
5. Идентификация штаммов сибиреязвенного микроба с атипичным капсулообразованием
6. Определение MLVA-генотипа

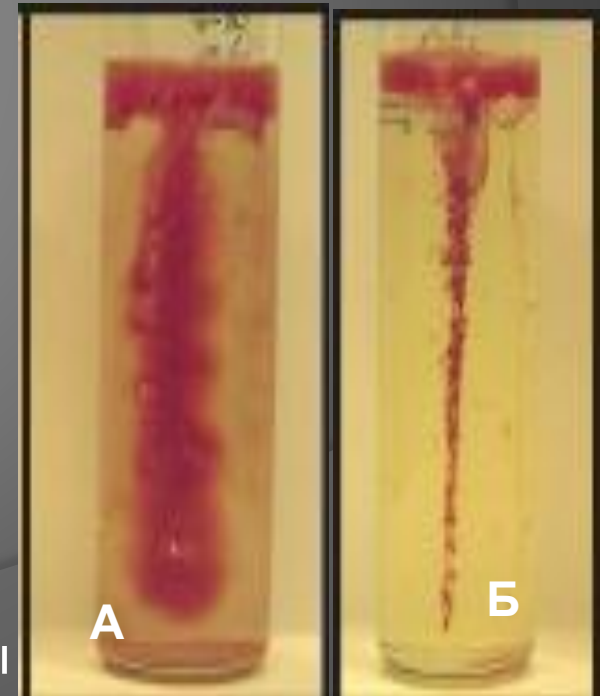
**Ускоренная идентификация – ПЦР с праймерами к генам с плазмидной и хромосомной локализацией**

# Тесты идентификации

- морфология клеток в мазках из бульонных и агаровых культу
- характер роста колоний на плотных и жидких питательных средах
- отсутствие подвижности в отличие от большинства спорообразующих сапрофитов (посев уколов в столбик полужидкого агара 0,2-0,3 %)



А – подвижные культуры  
Б – неподвижные культуры

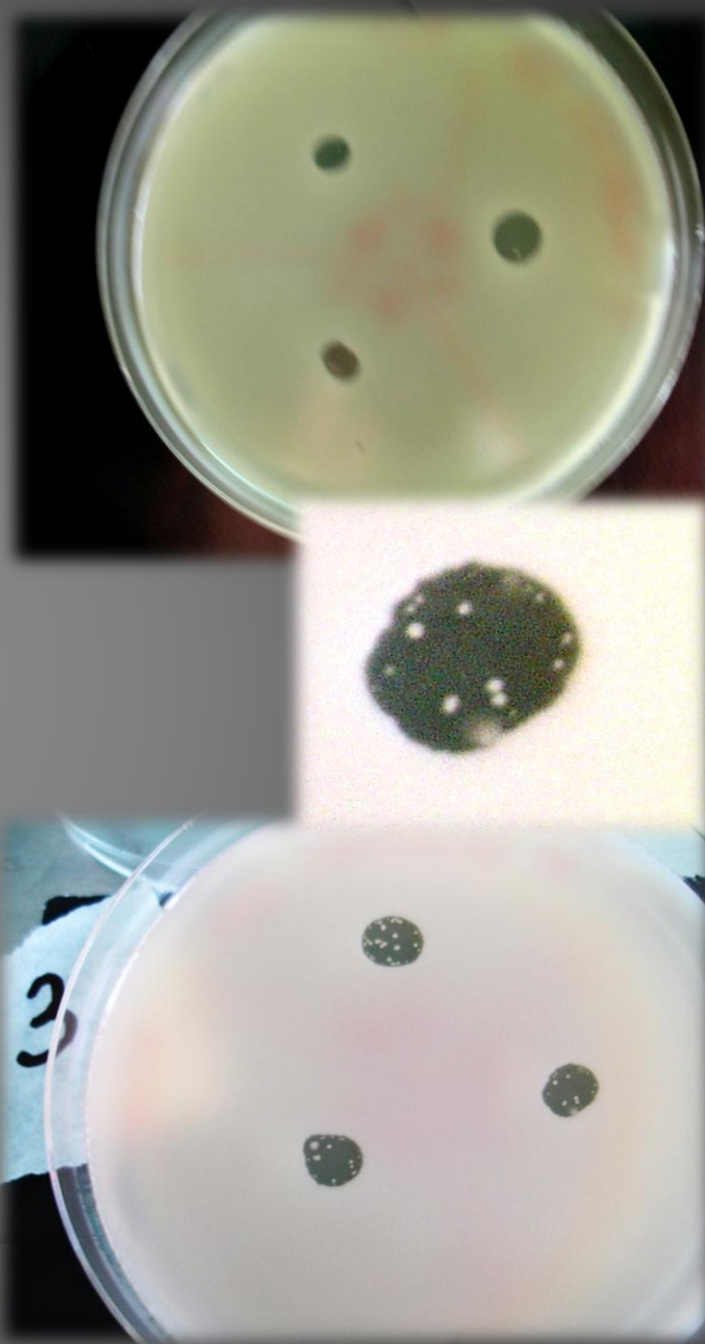


➤ определение чувствительность к сибиреязвенным бактериофагам

Используют 5-6-часовую бульонную культуру, наносят петлей каплю цельного сибиреязвенного бактериофага («Гамма», К, Фаh-ВНИИВВиМ и др.).

Результаты учитывают через 5-6 ч. инкубации чашек при  $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ , просматривая их под малым увеличением микроскопа.

В более поздние сроки через 12-24 ч. просматривают чашки невооруженным глазом



## ➤ тест на гемолиз

Используют МПА или агар Хоттингера (рН 7,2) с 3-5 % дефибринированной крови барана. Посев испытываемых культур производят бактериологической петлей секторами и инкубируют в термостате при  $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$  в течение 18-20 ч.

В эти сроки сибиреязвенный микроб не лизирует эритроциты барана в отличие от большинства родственных спорообразующих сапрофитов, образующих широкую зону гемолиза вокруг выросших колоний.



## ➤ обнаружение капсулы *in vitro*

Производят посев культур на 1% бикарбонатно-сывороточный агар или среду ГКИ, инкубируют при  $(36 \pm 1)$  °С в анаэроостатах при содержании 5-50 % CO<sub>2</sub> или в эксикаторе с притертой крышкой.

Просматривают посе́вы через 18-24 ч. Капсулообразующие культуры вырастают в виде крупных гладких блестящих слизистых колоний.

В мазках, окрашенных после их фиксации одним из методов (по Ребигеру, капсульно-соматической сибиреязвенной люминесцирующей сывороткой), видны цепочки палочек, окруженных хорошо выраженной капсулой.



## ➤ **тест «жемчужного ожерелья»**

2 % питательный агар разливают по 10 мл в 3 пробирки. В первую добавляют пенициллин из расчета 0,5 ЕД/мл, во вторую - 0,05 ЕД/мл, третья - без антибиотика - остается контрольной.

Содержимое каждой пробирки выливают в чашку Петри. После застывания наносят по одной капле изучаемых 3-6-часовых бульонных культур. Посевы инкубируют при  $(36\pm 1)$  °С.

Не позже 3 ч просматривают рост под микроскопом с иммерсионным объективом, предварительно накрыв каждый отмеченный участок покровным стеклом. На среде с пенициллином видны шарообразной формы бактериальные клетки, расположенные в виде цепочек, напоминающих ожерелье из жемчуга.

Спорообразующие сапрофиты, как правило, устойчивые к пенициллину, имеют обычную бациллярную форму.

В контрольной среде без пенициллина сибирезвенный микроб формирует длинные цепи палочек.

## ➤ модификация теста «жемчужного ожерелья»

К бульону Хоттингера (рН 7,2) добавляют стерильно 20 % инактивированной лошадиной сыворотки, 0,05 и 0,5 ЕД/мл пенициллина.

Среды разливают с соблюдением стерильности в пробирки по 2-3 мл и засевают по 2 капли бульонной или петлю агаровой культуры, взятой для исследования.

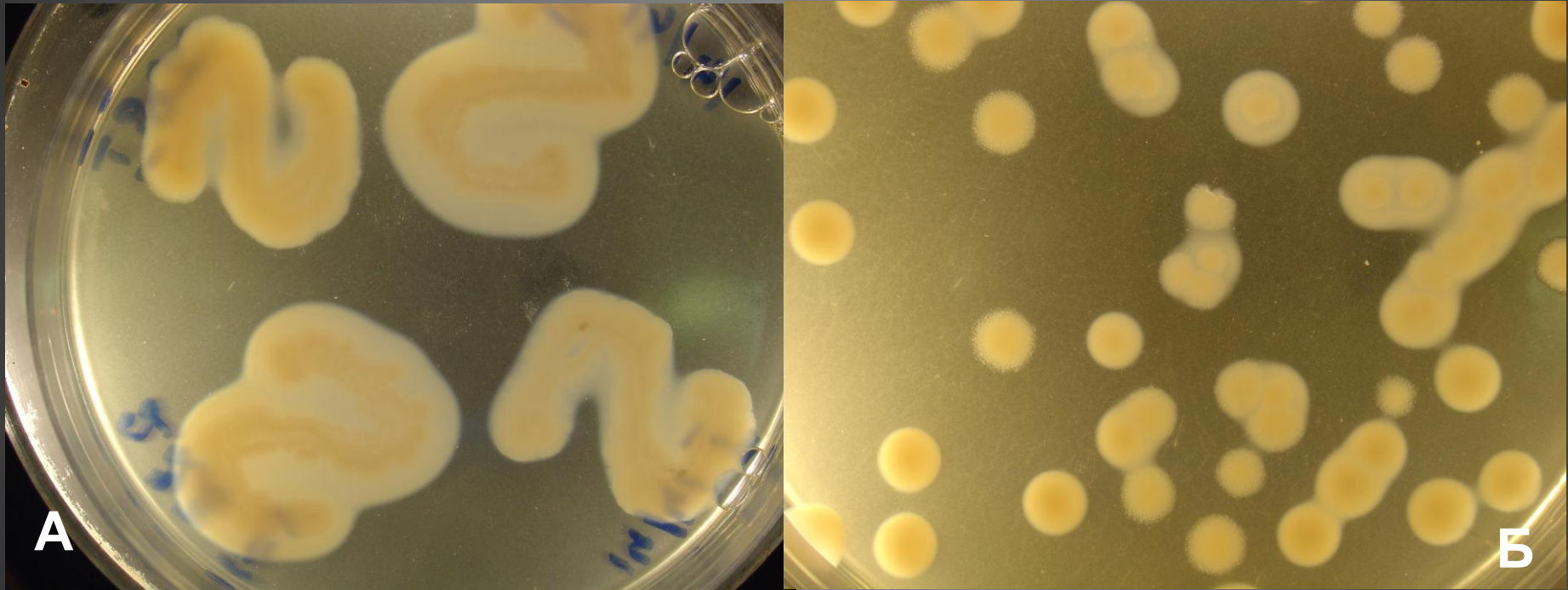
Пробирки с посевами инкубируют не более 3 ч. при  $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ . Затем делают мазки, их фиксируют и окрашивают по Ребигеру или метиленовой синькой.



# Дополнительные методы изучения культур

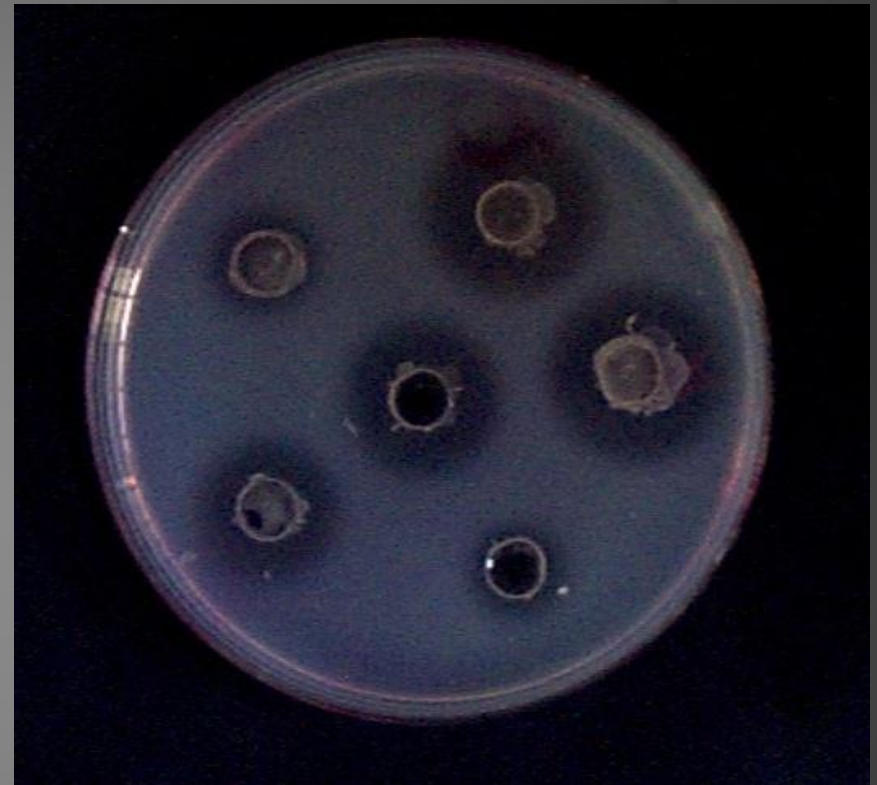
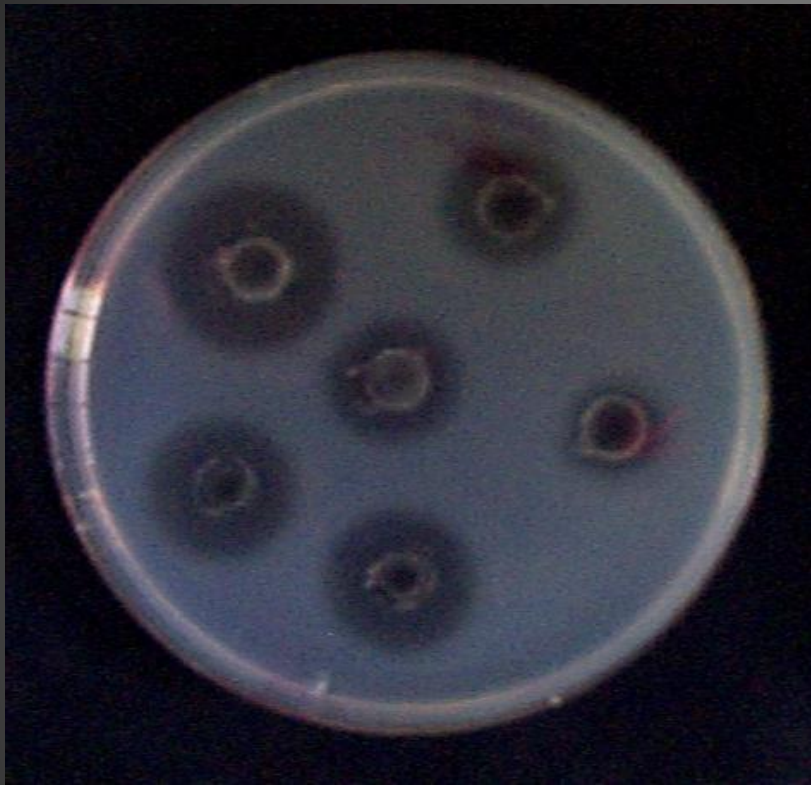
- Тест на лецитиназу
- Определения протеолитической активности
- Определение способности к росту на минимальной питательной среде
- Идентификация штаммов сибиреязвенного микроба с атипичным капсулообразованием
- Определение чувствительности к антибиотикам
- Определение MLVA-генотипа

# Изучение лецитиназной активности



Методом посева на агар Хоттингера с 5 % желтка:  
А – посевом вегетативной культуры штрихом,  
Б – взвеси спор.

# Изучение протеолитической активности



Зоны лизиса белковых субстратов вокруг лунок с культурами протеолитически активных штаммов *B. anthracis*

➤ определение способности к росту на минимальной питательной среде

Готовят минимальную питательную среду «9 АТ». Споры изучаемых штаммов засевают на среду «9АТ» и выращивают в течение 24-48 ч. при температуре  $(36\pm 1)$  °С. Для контроля засевают на эту среду споры штамма *B. anthracis* 81/1.

Если исследуемые штаммы не растут на этой среде через 48 ч., то их можно считать нуждающимися в дополнительных факторах роста.

## ➤ определение MLVA-генотипа штаммов сибиреязвенного микроба

Целесообразно проводить по схеме и с использованием метода, описанного Р. Keim et al. (2000).

Такое генетическое типирование позволяет дифференцировать штаммы, установить их происхождение, осуществлять мониторинг в процессе эпидемиологического анализа вспышки. Исследование проводится в референс-лабораториях.

# Окончательные результаты полного лабораторного анализа

- тест с сибиреязвенным бактериофагом
- тест на щелочную фосфатазу
- тест на гемолиз на агаре с дефибрированной кровью барана
- тест на лецитиназу
- тест на подвижность
- тест «жемчужного ожерелья»
- результаты аллергической реакции с антраксином (через 24 и 48 ч)
- МФА (непрямой метод) с сывороткой больного



# Критерии постановки диагноза у людей

- соответствующая клиническая картина
- эпидемиологический анамнез,
- лабораторное подтверждение, включающее:
  - выделение из патологического материала культуры *B. anthracis* и гибель хотя бы одного зараженного лабораторного животного и выделение из его органов культуры со свойствами, характерными для возбудителя сибирской язвы;
  - выделение вирулентной культуры *B. anthracis* из предполагаемого источника или фактора передачи;
  - положительная антраксиновая проба.

Если через 72 ч. положительные результаты не получены, окончательное заключение выдается не ранее 10 сут. после заражения биопробных животных