

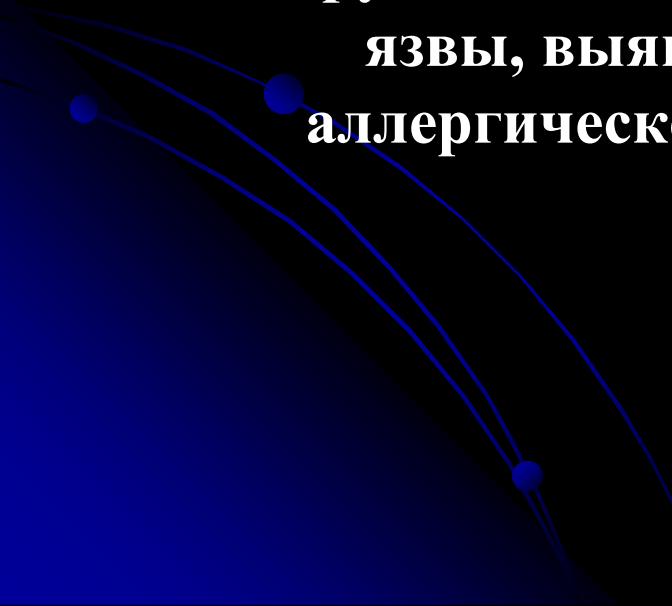
Лабораторная диагностика сибирской язвы

Цыганкова О.И.



**Диагностика сибирской язва у человека и животных
основывается на эпизоотологических ,
эпидемиологических, клинических, лабораторных и
патологоанатомических данных.**

**Лабораторные исследования направлены на
обнаружение и идентификацию возбудителя сибирской
язвы, выявление специфических антител и
аллергической перестройки в организме людей**



Исследование на сибирскую язву

включает:

- **высевы на питательные среды,**
- **микроскопию мазков из исходного материала,**
- **постановку основных и дополнительных методов идентификации,**
- **использование МФА для антигенов и антител к ним,**
- **постановку ПЦР,**
- **проведение биопробы,**
- **применение реакции преципитации.**

- У человека и свиней, в случае невозможности установить диагноз вышеперечисленными методами, обязательна постановка клинической кожно-аллергической пробы с сибиреязвенным аллергеном.

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

МУК 4.2.2413-08 «Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы» утвержденными 1.09.2008 г. Главным государственным санитарным врачом РФ

МУК 4.2.2413-08 «Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы» предназначены для специалистов органов и организаций Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, ветеринарных учреждений Россельхознадзора, других организаций независимо от организационно-правовой формы.

Материал для исследования:

- от больных или подозрительных на заболевание людей – содержимое везикул, отделяемое карбункула или язвы, фрагменты струпов, 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.

Документы, регламентирующие работы по забору, транспортированию, и подготовке проб клинического и секционного материала от людей и животных, из внешней среды:

- **СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности);**
- **СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-V групп патогенности» ;**
- **МУ 1.3. 2569 -09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I – IV групп патогенности».**

Забор материала от животных

- I. Для бактериологического исследования:**
 - 1. в случае падежа животного с подозрением на сибирскую язву – ухо и мазок из надреза:**
 - 2. если подозрение возникло во время вскрытия, то манипуляции по вскрытию прекращают и на исследование направляют кровь, кусочки органов (селезенки, печени, лимфоузлов), костный мозг. У трупов свиней – заглочочные лимфоузлы;**
 - 3. у больных животных – кровь из яремной вены, или из вены уха, хвоста**

Забор материала от животных

II. Для исследования методом ПЦР:

микропробы тканей массой 0,1-1 г от больных животных или трупов помещают в пластиковые пробирки с завинчивающимися крышками объемом 1,5-1,7 мл с 0,9 % раствором NaCl или транспортной средой.

Забор материала от человека

Для бактериологического исследования (**производится до начала специфического лечения**) :

1. При кожной форме – содержимое везикулы, отделяемое язвы, отторгаемые струпы;
2. При всех клинических формах – кровь;
3. При висцеральных формах и менингите – спинномозговую жидкость мокроту, испражнения;
4. При подозрении на ингаляционный способ заражения – мазки из полости носа

Забор материала от человека

Для исследования методом ПЦР:

Забор проб осуществляется в пластиковые пробирки однократного применения

1. Кровь в 6 % раствор ЭДТА 1:20;
2. Содержимое везикул, отделяемое карбункулов, фрагменты струпов в пробирки с 0,1-0,2 мл транспортной среды;
3. Спинномозговую жидкость в количестве 0,5 мл в стерильную пробирку;
4. Мазки из полости носа берут сухим тампоном и помещают в пробирку с транспортной средой.

Транспортирование осуществляется при +2-8 °С

Забор материала из сырья животного происхождения и объектов внешней среды проводится в тех случаях, когда необходимо установить источник инфекции или фактор передачи, для выявления обсемененности спорами возбудителя сибирской язвы отдельных объектов, а также в целях обнаружения микроба в местах старых скотомогильников при проведении строительных, мелиоративных, гидротехнических и других работ, связанных с выемкой и перемещением грунта.

Забор материала из объектов внешней среды

Почва

- 1. Почва. Отбор проб почвы проводят в соответствии с «Методическими рекомендациями по отбору проб почвы для бактериологического исследования на наличие возбудителя сибирской язвы и актиномицетов-антагонистов» (М. 1984 г.)**
 - пробы с мест вероятного обсеменения (мест вынужденного убоя или падежа скота, стоянок и водопоя животных берут с глубины 15 см – 200 г.**
 - На территории старых скотомогильников – до глубины 2 м через каждые 25 см – 200 г. Забор проводят по углам и центру квадратов 4x4 м.**

Забор материала из объектов внешней среды

Почва

1. Каждую пробу почвы весом 100-200 г помещают мешочки из плотной ткани с завязками или широкогорлую лабораторную посуду, которую сверху завязывают такой же тканью для предотвращения размножения актиномицетов.
2. Вынутую из глубины почву смешивают с сухой хлорной известью (25 % активного хлора) в соотношении 1:3. слегка увлажняют и сбрасывают в шурф. Инструменты обжигают огнем паяльной лампы.

Забор материала из объектов внешней среды

Вода

- 1. Пробы воды во всех водоемах берут у поверхности (на глубине 10-15 см) и у дна при помощи бутирометра. Объем каждой пробы не менее 0,5 л, общий объем проб – не менее 1л.**
- 2. Кроме того берут пробы придонного осадка, который исследуют, как почву.**

Забор материала из объектов внешней среды

Корма

- Концентрированные корма (зерно, отруби, комбикорм) незатаренные отбирают из расчета 1 проба не менее 400 г на 4 м² поверхности, но не менее 5 проб от каждого закрома, партии из различных слоев корма. Затаренные корма отбирают от каждой упаковочной единицы.
- Пробы грубых кормов (сено, солома) из разных мест скирды из расчета 1 проба (40 г) на 4 м² площади скирды
- Зеленую массу отбирают, как грубые корма

Забор материала из объектов внешней среды

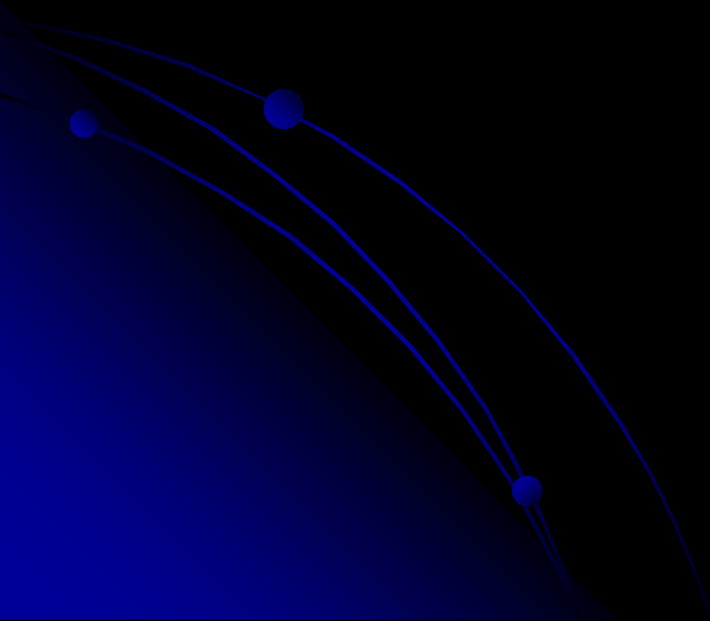
Корма

- **Корнеплоды отбирают из расчета 1-3 шт. на 4 м² площади бурта, отсека. Скальпелем срезают поверхностный слой в местах скопления земли, который и используют для исследования.**
- **В лабораторию направляют среднюю пробу, которую составляют из хорошо перемешанных первичных проб данной партии , емкости и т.д. Масса средней пробы должна быть не менее 500 г.**

Забор материала из объектов внешней среды

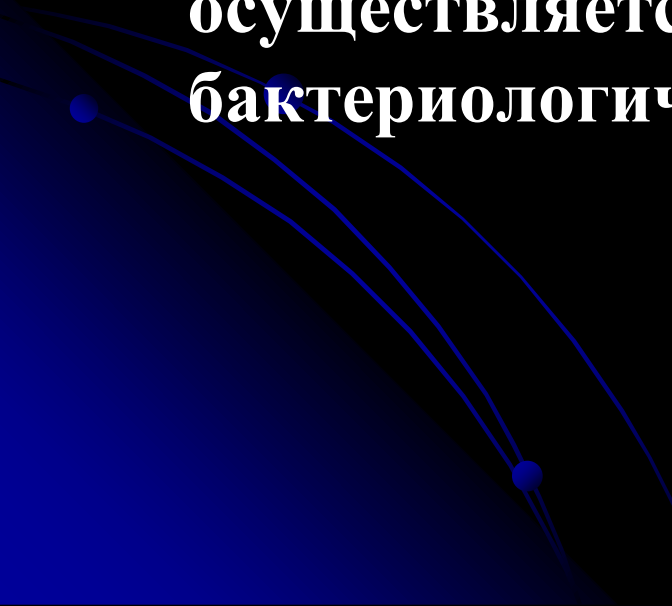
Воздух

- Пробы воздуха отбирают с помощью специальных приборов, снабженных собирающей жидкостью или фильтрами. Объем исследуемого воздуха должен быть не менее 3-5 м³.



Забор материала из объектов внешней среды

Для исследования методом ПЦР

- **Отбирают пробы из объектов внешней среды, пищевых продуктов, (мясо и продукты животного происхождения), сухих и сочных кормов, подстилки, шкур, шерсти, почвы, воды, смывов с поверхностей. Отбор проб осуществляется так же, как и для бактериологического исследования.**
- 

Упаковка проб материала, направляемого на исследование

- Патологический материал помещают в стерильную посуду (пробирки, банки и т. д.)
- Высушенные на воздухе мазки кладут в стерильные чашки Петри, которые обертывают плотной бумагой с надписью «мазок не фиксирован».
- Пробы почвы, кормов, и других сыпучих объектов помещают в сухие стерильные стеклянные банки и закрывают стерильной крышкой, пробкой или пергаментом (кроме проб почвы).
- Пробы воды наливают в стерильные бутылки и закрывают резиновыми пробками.

Упаковка проб материала, направляемого на исследование

Допускается использование одноразовых стерильных или многоразовых автоклавируемых флаконов.

Все пробы нумеруют, емкости заворачивают в лигнин или гигроскопическую вату в количестве, достаточном для сорбции всей жидкости в случае повреждения упаковки. Пробы упаковывают во влагонепроницаемую тару, опечатывают, делают надпись «верх, осторожно»

Этикетирование проб и сопроводительные документы

Все емкости нумеруются. Надпись должна быть четкой крупной, контрастной по цвету стойкой.

В сопроводительной к пробам указывают причину проведения исследования, какой материал и в каком количестве направляют, место и дату отбора проб материала.

В направлении к материалу от больного человека или трупа указывают фамилию, имя, отчество больного (умершего) наименование материала, место и время его взятия, предположительный диагноз.

Этикетирование проб и сопроводительные документы

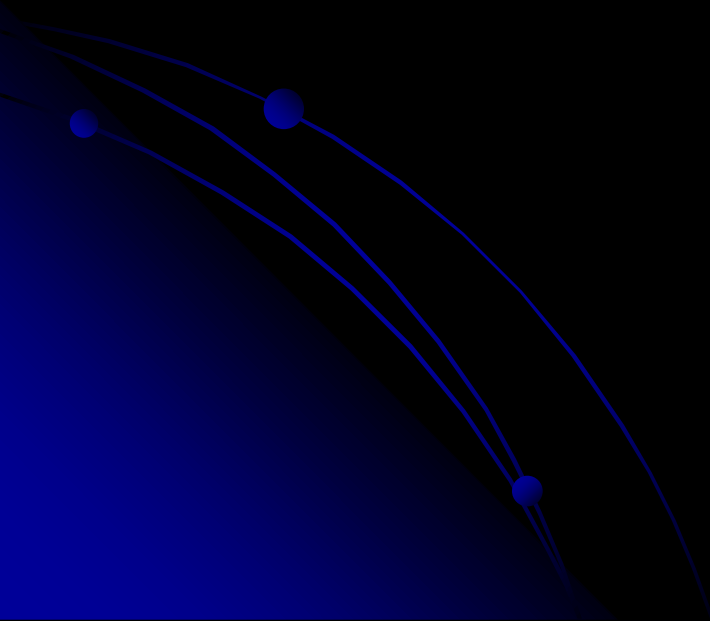
Для проб шерсти и кормов дополнительно указывают происхождение, объем партии, вид упаковки и количество упаковочных единиц.

К сопроводительным документам прилагают опись с указанием места отбора каждой пробы.

При отборе проб из объектов внешней среды находящихся вне поселений желательно прилагать схему местности с указанием точек забора проб с привязкой к стационарным ориентирам.

Условия транспортирования материала

Пробы материала и сопроводительные документы (обязательно отдельно от проб материала) доставляются **нарочным на спецтранспорте** в учреждение, которое будет проводить исследование.



Порядок и объем работ по лабораторной диагностике сибирской язвы в различных учреждениях

В лечебных учреждениях, куда поступает больной с подозрением на сибирскую язву, производится забор материала, который направляется в лаборатории особо опасных инфекций Центров гигиены и эпидемиологии, в противочумные учреждения. В лечебных учреждениях больным с подозрением на сибирскую язву также производят постановку кожной аллергической пробы с антраксином.

Порядок и объем работ по лабораторной диагностике сибирской язвы в различных учреждениях

В лабораториях особо опасных инфекций Центров гигиены и эпидемиологии, в противочумных учреждениях проводят специфическую индикацию, выделение культур и их идентификацию основными методами, используя при наличии возможностей дополнительные методы.

- Материал от животных (трупов) исследуют всеми методами в ветеринарных лабораториях, специализированных центрах и ветеринарных НИИ.**

Порядок и объем работ по лабораторной диагностике сибирской язвы в различных учреждениях

- **Выделенные в лабораториях учреждений Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека культуры *B. anthracis* после идентификации, вместе с паспортами направляют в вышестоящие учреждения в соответствии с установленным действующими документами порядком.**
- **Культуры, выделенные в учреждениях ветеринарного профиля, направляются для окончательной идентификации во Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии (г. Покров).**

- **Алгоритмы** действий получателей материала, в котором предполагается наличие порошка, содержащего споры возбудителя сибирской язвы и других патогенных биологических агентов (подозрительных почтовых отправок), а также специалистов, участвующих в проведении противоэпидемических мероприятий и лабораторных исследований, определены методическими рекомендациями **МР 0100/0556-04-34 «Взаимодействие органов управления, учреждений и специализированных формирований при ликвидации последствий террористических актов с применением патогенных биологических агентов и опасных химических веществ».**

Подготовка проб к исследованию бактериологическим методом

Пробы органов и тканей

- Кусочки проб мяса, органов и тканей от трупов помещают в ступку, измельчают ножницами, растирают пестиком, заливают 0,9 % раствором NaCl в соотношении 1:10. Суспензию через марлевый тампон отсасывают пипеткой или шприцом в стерильную посуду.

Подготовка проб к исследованию бактериологическим методом

Вода

- Воду с илистыми частицами фильтруют через 3 слоя стерильной марли, а при их отсутствии исследуют без предварительной подготовки.
- С целью концентрирования воду фильтруют через фильтры № 3 или центрифугируют при 6000 об./мин в течение 15 мин. Осадок с фильтра или после центрифугирования ресуспендируют в 1-2 мл 0,9 % раствора NaCl и используют для исследования.

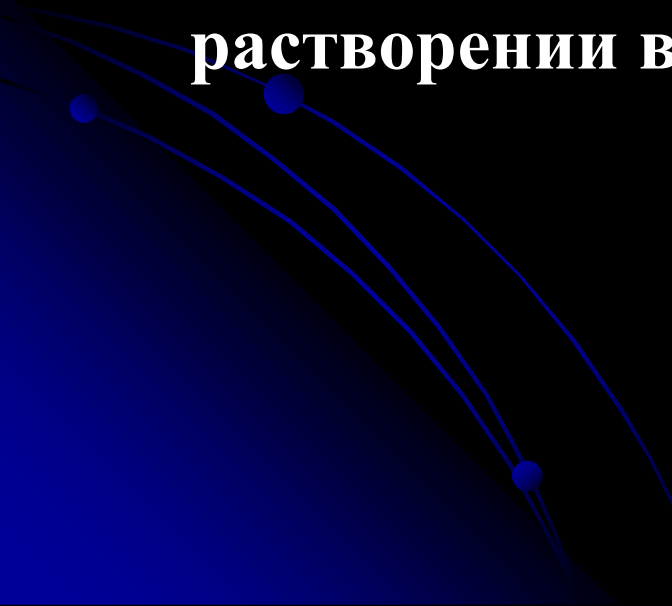
Подготовка проб к исследованию бактериологическим методом

Пробы почвы

- Освобождают от корней растений, камней, тщательно перемешивают. От каждой пробы берут 90-100 г почвы, помещают в колбу, и заливают стерильным 0,9 % раствором NaCl или 5 % раствором пиррофосфата натрия из расчета получения 15-20 мл суспензии. Колбу закрывают, тщательно встряхивают в течение 5-10 мин, отстаивают 3-5 мин. Отбирают надосадочную жидкость для исследования.

Подготовка проб к исследованию бактериологическим методом

Пробы порошкообразных веществ

- Порошкообразные вещества, в том числе пищевые продукты и корма, обрабатывают аналогично почве, используя в дальнейшем надосадочную жидкость или раствор при растворении вещества
- 

Подготовка проб к исследованию бактериологическим методом

Пробы шкур

Кусочки шкур массой 1 г помещают в фарфоровую ступку и заливают стерильным 0,9 % раствором NaCl в соотношении 1:10. Измельчают ножницами и оставляют на 2-3 часа для размягчения. Тщательно растирают пестиком, отбирают жидкость для исследования.

Подготовка проб к исследованию бактериологическим методом

Пробы шерсти

- От каждой пробы шерсти отбирают наиболее загрязненные части, измельчают ножницами и вместе с пылью помещают в колбу и заливают стерильным 0,9 % раствором NaCl. Колбу закрывают, тщательно встряхивают в течение 10-15 мин. Для освобождения от грубых частиц пробу фильтруют через 2-3 слоя марли.

Подготовка проб к исследованию бактериологическим методом

- Для избавления от посторонней микрофлоры, подготовленные по выше описанной процедуре пробы из объектов внешней среды, шерсти и кожи, пищевых продуктов делят на 2 части, одну из которых подвергают термической обработке на водяной бане при 80 °С в течение 20 мин.
- Пробы от больного человека и животного, из патологического материала и мяса животных, где возбудитель находится в вегетативной форме не прогревают.

Подготовка проб к исследованию методом ПЦР

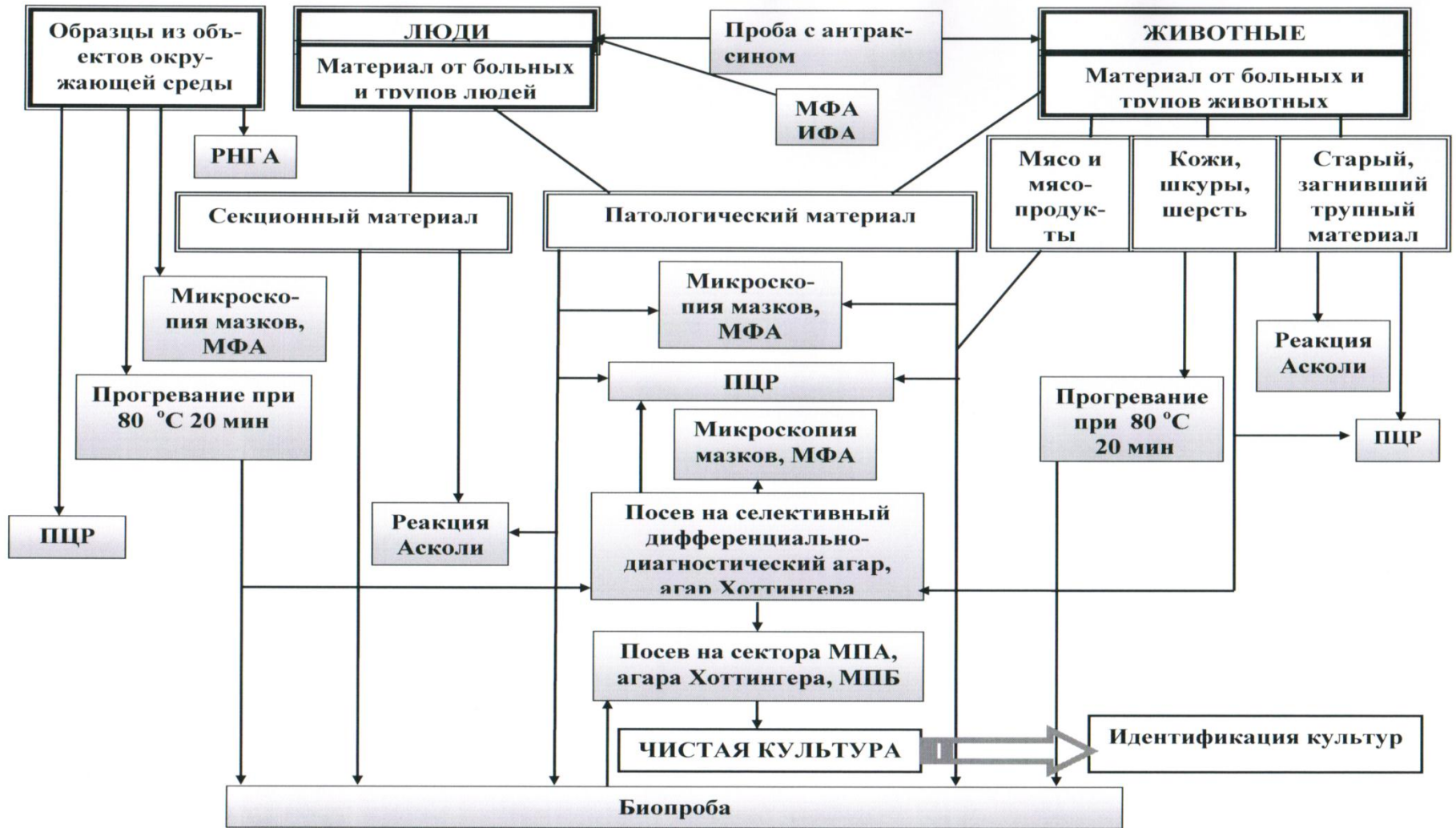
- Сыворотку получают обычным способом,
- Микроаутоптаты, сыворотка крови, содержимое везикул, отделяемое язв, мазки из полости носа и спинномозговая жидкость предварительной обработки не требуют.
- Другие виды материала обрабатывают так же, как и для бактериологического исследования, отбирают отдельным наконечником с аэрозольным фильтром пробу в количестве 0,1-0,5 мл в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл.

Проведение исследования

Делится на два этапа:

1. **Обнаружение возбудителя или его компонентов (ДНК, антигенов) в организме больных людей, животных, секционном материале или объектах окружающей среды, с которыми имели контакт заболевшие и которые могли быть источником инфицирования.**
2. **Выделение и идентификации чистой культуры возбудителя с последующим изучением ее свойств**

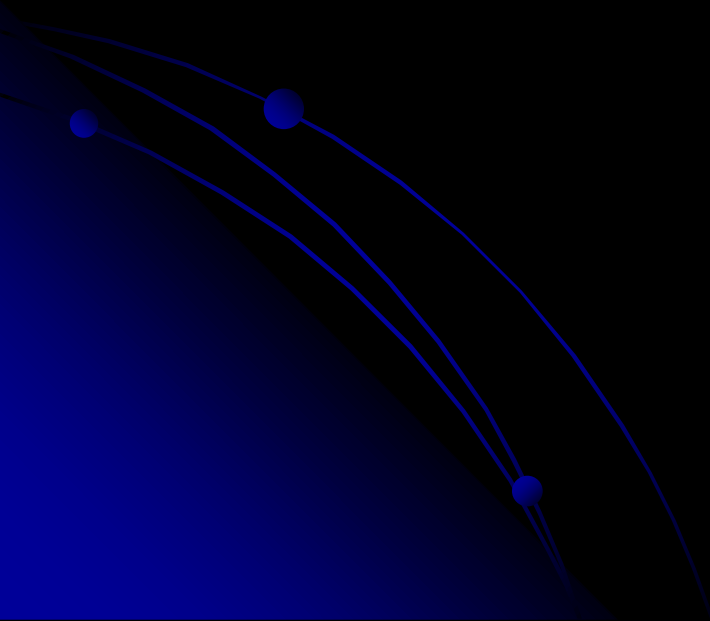
Схема исследования наличие возбудителя сибирской ЯЗВЫ



Бактериологический метод

Посев на питательные среды

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



Бактериологический метод

Посев на питательные среды

- Для засева одной пробы желательно использовать не менее 5 чашек. Поверхность агара перед посевом должна быть совершенно сухой. Посев необходимо производить с помощью шпателя, предварительно нанося на поверхность агара 1-2 капли (0,1 мл) исследуемого материала. Если материал значительно загрязнен посторонней микрофлорой (почва, корма, смывы с поверхностей и пр.), делают посевы методом истощения, распределяя материал шпателем по поверхности агара с переносом на 2-3 чашки..

Бактериологический метод

Посев на питательные среды

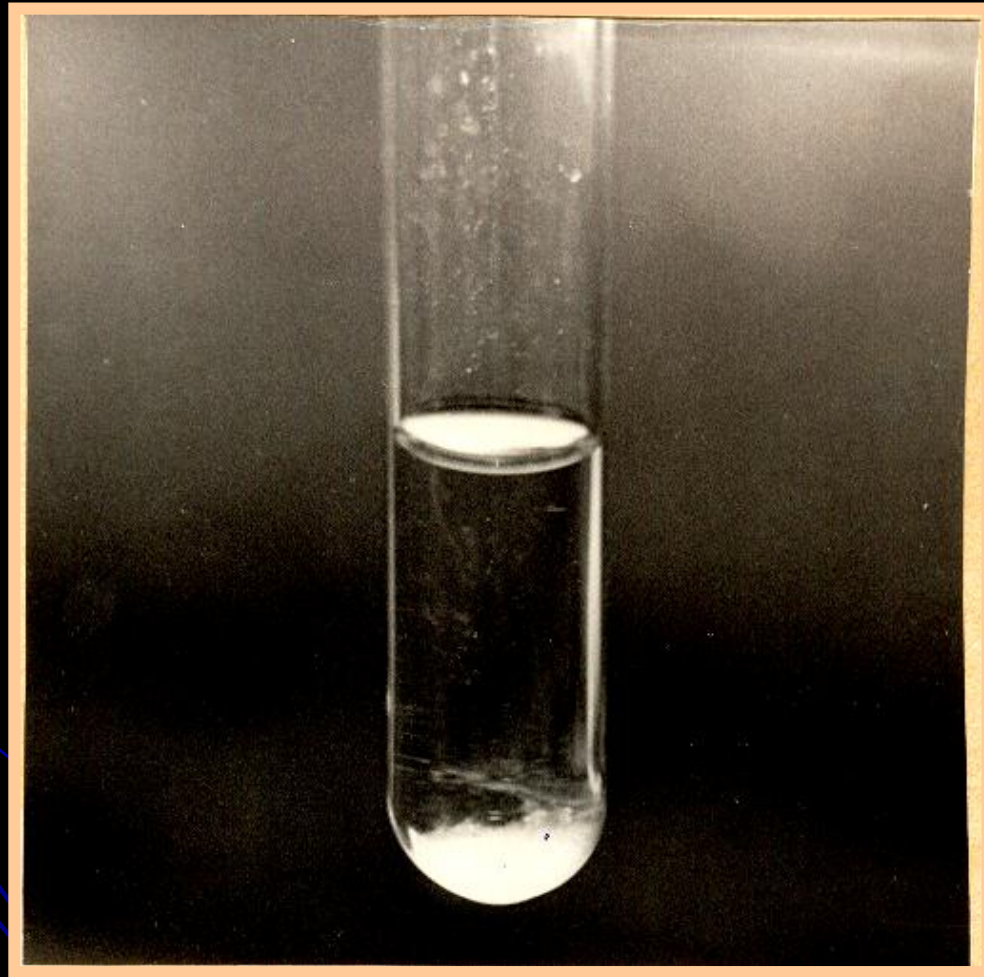
При исследовании материала, слабо загрязненного посторонней микрофлорой (кровь, пунктаты из карбункула, органы биопробных животных), посев можно проводить петлей без истощения, используя при этом МПА, агар Хоттингера, кровяной агар и МПБ. Посевы помещают в термостат при $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ на 18-20 ч и при отсутствии роста выдерживают при той же температуре 48 ч.

Бактериологический метод

Посев на питательные среды

- После суточного роста сибиреязвенного микроба МПБ остается прозрачным, на дне образуется рыхлый осадок в виде «комочка ваты» При встряхивании пробирки бульон не мутнеет, осадок разбивается с трудом на мелкие хлопья. В отдельных случаях в МПБ появляется диффузный рост культуры (легкое помутнение), при встряхивании образуются муаровые волны, на поверхности бульона может наблюдаться рост в виде пристеночного кольца

Типичный рост *Bacillus anthracis* в бульоне
через 18-20 часов – «комочек ваты» на дне



Бактериологический метод

Посев на питательные среды

Из бульонной культуры делают мазки, окрашивают по Граму и исследуют под микроскопом. В мазках из бульонной культуры обнаруживают типичные цепочки, состоящие из сибиреязвенных палочек.



Для получения чистой культуры из бульона делают высевы на плотные питательные среды петлей для получения изолированных колоний.

Бактериологический метод

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 (R-форма) 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.

Бактериологический метод

Просмотр посевов на плотных питательных средах

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) без крышки помещают на несколько секунд (пока не порозовеют колонии сапрофитов) в крышку с аммиаком. Таким образом обрабатывают все посевы.

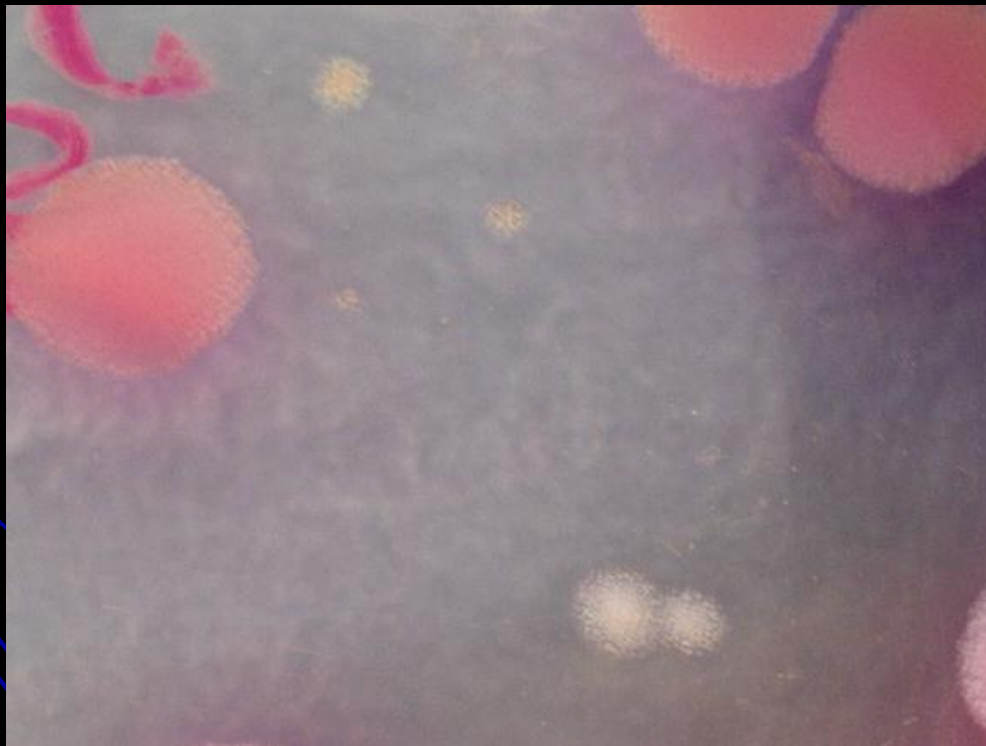
Бактериологический метод

Просмотр посевов на селективной питательной среде

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*, под действием паров аммиака приобретают розовый или красный цвет. С дифференциально-диагностической среды для выделения чистой культуры отбирают визуально и с помощью микроскопа при малом увеличении все колонии, не изменившие своего цвета после обработки парами аммиака или слабо порозовевшие

Бактериологический метод

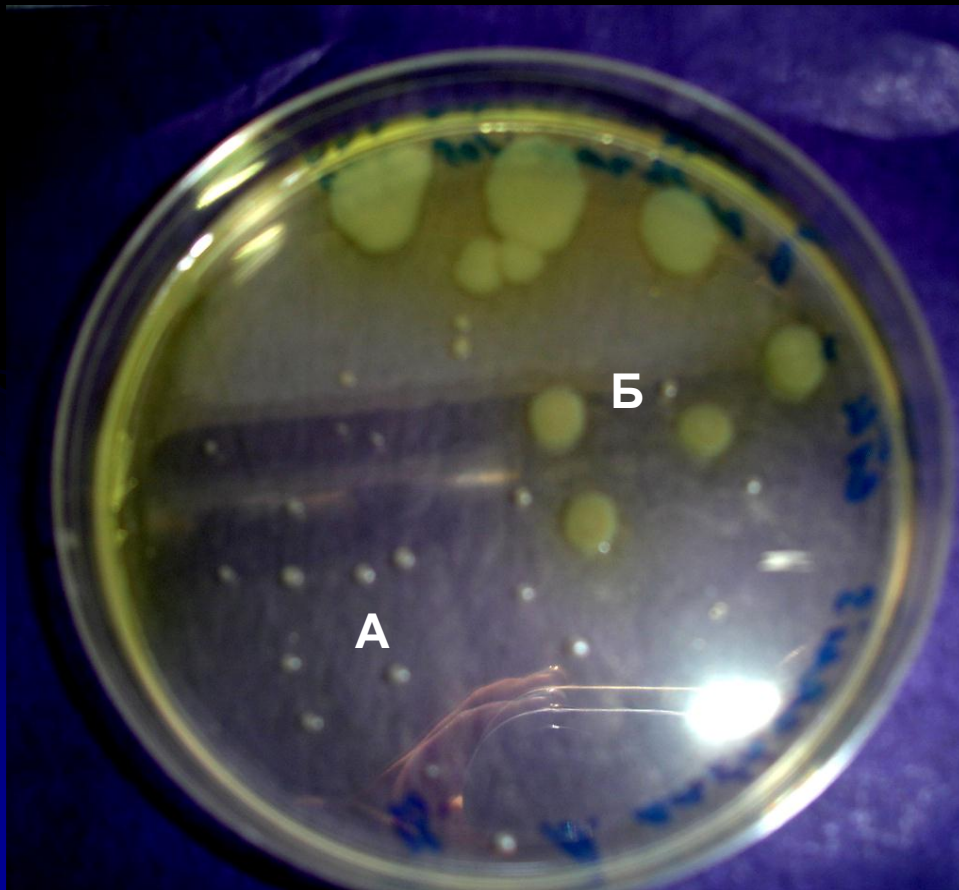
Просмотр посевов на плотных питательных средах
селективная дифференциально-диагностическая среда с
фенолфталеинфосфатом натрия



А – колонии *B. anthracis*; Б – колонии *B. cereus*.

Бактериологический метод

Просмотр посевов на плотных питательных средах
селективная дифференциально-диагностическая среда с
пара-нитрофенилфосфата динатриевой солью



А – колонии *B. anthracis*

Б – колонии *B. cereus*

Вид колоний сапрофитов на селективных дифференциально-диагностических средах с использованием теста на фосфатазу



Субстраты:

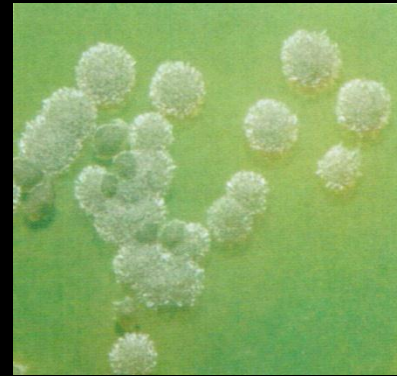
А – фенолфталеинфосфат натрия;

Б – паранитрофенилфосфата динатриевая соль.

Вид колоний на диагностической питательной среде с сорбитом для выделения и дифференциации сибиреязвенных культур и спорообразующих сапрофитов



Цвет питательной среды



Колонии *B. anthracis*



Колонии *B. thuringiensis*



Колонии *B. cereus*

Бактериологический метод

Отбор культур для идентификации

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 люминесцирующей соматической сывороткой. Для идентификации отбирают только колонии чистой культуры. Их отсевают на секторы МПА или агара Хоттингера. Материал из всех других отобранных колоний рассевают петлей на отдельных чашках Петри с МПА или агаром Хоттингера для получения изолированных колоний.

Бактериологический метод

Отбор культур для идентификации

- На этом этапе исследования для получения чистой культуры сибиреязвенного микроба важно проводить рассев на неселективной среде. Посевы помещают в термостат на 18-20 ч, после чего проводят учет и отбор колоний для дальнейшей идентификации по полной схеме лабораторного исследования.
- Из изолированных колоний повторно делают мазки, их фиксируют и окрашивают, как описано выше. При отсутствии достаточного количества культуры исследование проводят на следующие сутки после накопления биомассы.

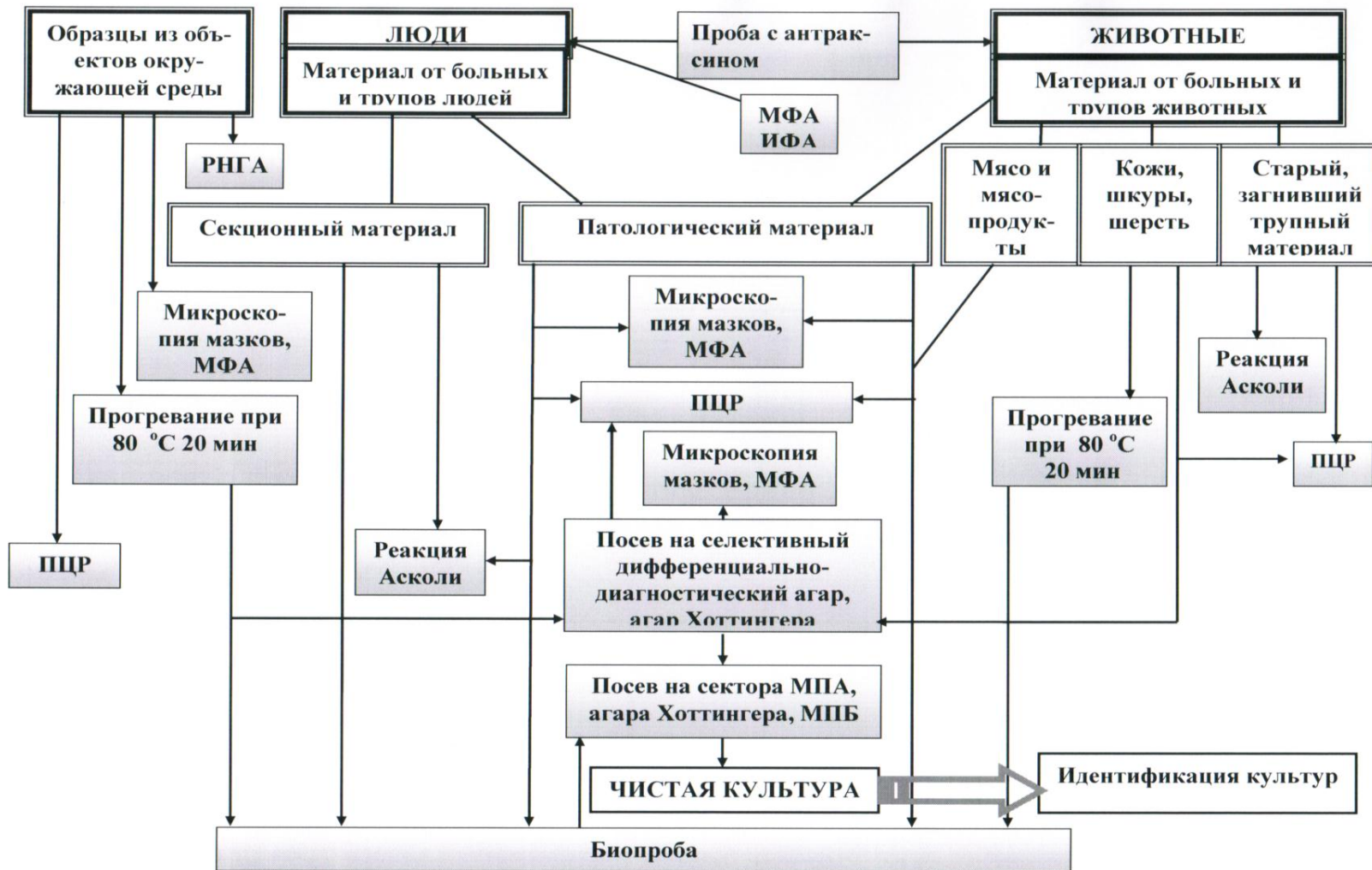
Биологический метод

- В день поступления материала одновременно с бактериоскопией и посевами на питательные среды с целью выделения возбудителя сибирской язвы в обязательном порядке проводят биологическую пробу на восприимчивых лабораторных животных.
- Для постановки биологической пробы используют белых беспородных мышей (массой 18-20 г), морских свинок (массой 350-400 г) или золотистых хомяков (массой 60-80 г). 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.

Биологический метод

- При вскрытии трупов биопробных животных, павших от сибирской язвы, отмечают характерный для сибиреязвенной инфекции студенистый геморрагический отек подкожной клетчатки на месте введения материала, гиперемии внутренних органов, увеличение селезенки и несвернувшуюся кровь. Из тканей и органов павших животных делают мазки-отпечатки, а так же посевают на МПА или агар Хоттингера и селективную среду.

Схема исследования материала на наличие возбудителя сибирской язвы



Бактериоскопия

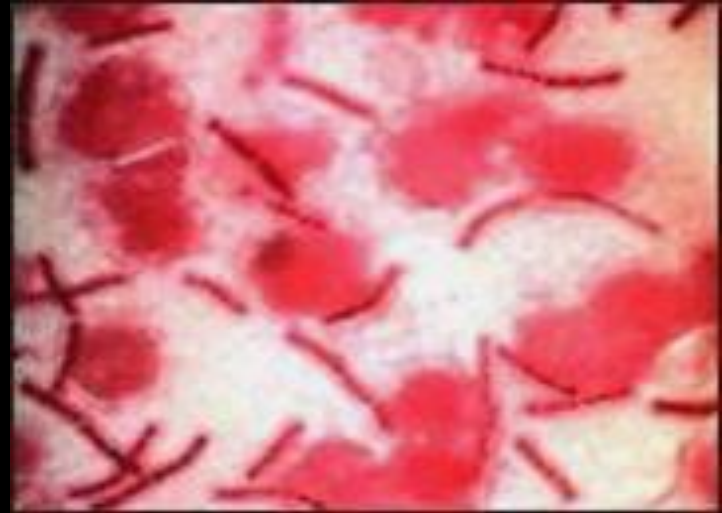
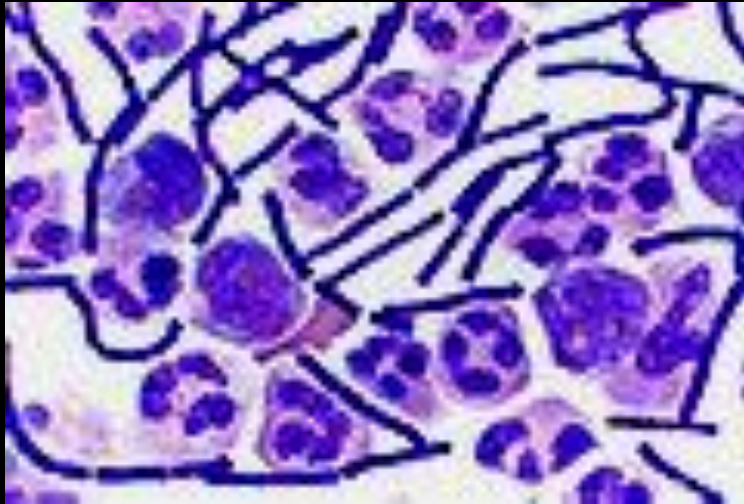
Световая микроскопия

Из поступивших на исследование проб патологического материала (от людей и животных) готовят несколько мазков, подсушивают их на воздухе, фиксируют в течение 30 мин в спирте с добавлением 3 % перекиси водорода.

Окрашивают по Граму и на капсулу одним из методов (по Ребигеру, Михнину, Романовскому-Гимзе, Ольту, Бурцеву, Ионе, Кауфману, Антони, Гису, Фоту). Наиболее эффективна окраска капсулы методами Ребигера и Михнина.

Бактериоскопия

Световая микроскопия



Бактериоскопия

Выявление капсулы по Ребигеру.

- **Раствор Ребигера:** 15-20 г генцианвиолета растворяют в 100 мл 40% формалина. Раствор выдерживают при комнатной температуре в течение нескольких часов, после чего фильтруют.
- **Окраска:** на всю поверхность мазка наносят раствор Ребигера и после экспозиции 30-60 сек смывают водой, высушивают.
- **Вид микроба в окрашенных мазках:** тело микробной клетки темно-фиолетовое, капсула вокруг микроба – розовая или красно-фиолетовая. В мазках из патматериала палочки в виде коротких цепочек, увеличины, края закруглены

Бактериоскопия

Выявление капсулы по Михнину.

- **Окраска:** на всю поверхность фиксированного мазка (преимущественно из паренхиматозных органов и крови) наносят раствор леффлеровской синьки на 2-3 мин подогревают до появления пара. Краску смывают водой, мазки просушивают фильтровальной бумагой, микроскопируют.
- **Вид микроба в окрашенных мазках:** капсула вокруг микробных клеток светло-розовые, микробные клетки — темно-синие.

Бактериоскопия

Выявление спор

- Споры обычными спиртово-водными растворами не окрашиваются. Окрашивание происходит при нагревании или при воздействии фенола. Для окраски спор *B. anthracis* пригодны методы: Ауески, Златогорова, Пешкова, Меллера, Этрухильо, Дорнера, Клейна, и др.
- Наиболее эффективным является окрашивание по методу Циля-Нильсена

Бактериоскопия

Окрашивание спор методом Циля-Нильсена

- На фиксированный мазок накладывают фильтровальную бумагу и на нее наносят в избытке карболовый фуксин Циля. Нагревают на слабом пламени до появления паров и оставляют на 2-3 мин. Удаляют бумагу с краской, промывают ДВ, обесцвечивают 5 % соляной кислотой 3-5 сек, промывают ДВ, споласкивают 96 % спиртом (5-10 сек.), промывают ДВ. Докрашивают раствором метиленового синего Леффлера, промывают, просушивают, микроскопируют.

Бактериоскопия

Окрашивание спор методом Циля-Нильсена

Результаты микроскопии

- В мазке видны интенсивно синие микробные клетки и три типа окраски спор в зависимости от их физиологического состояния:
 - 1) розовые с более интенсивной окраской по периферии – жизнеспособные споры;
 - 2) равномерно окрашенные в красный цвет – слабо жизнеспособные;
 - 3) синие и фиолетовые споры – нежизнеспособные.

Люминисцентная микроскопия

- Для выявления вегетативной формы *B. anthracis* в мазках-отпечатках экссудата брюшной полости органов биопробных животных, в мазках-отпечатках из отечной жидкости и внутренних органов людей и животных, в мазках из подозрительных колоний на высушенные фиксированные мазки наносят в рабочих разведениях диагностические сибиреязвенные люминесцирующие адсорбированные соматические иммуноглобулины.

Люминисцентная микроскопия

- Мазки из смывов, суспензий, вытяжек материалов, подозрительных на высокую контаминацию возбудителем сибирской язвы, обрабатывают в рабочих разведениях сибиреязвенными диагностическими люминесцирующими адсорбированными иммуноглобулинами (**антиспоровой или соматической**).

Люминисцентная микроскопия

Окраска мазков люминесцирующими иммуноглобулинами

- Мазки с нанесенными на них люминесцирующими иммуноглобулинами помещают во влажную камеру при 37 °С на 20 мин.
- Тщательно промывают 2 раза по 10 мин в 0,9 % растворе NaCl, в ДВ.
- Высушивают на воздухе.
- Микроскопируют под иммерсией с использованием нефлуоресцирующего иммерсионного масла (можно использовать смесь, содержащую 1ч 0,9 % раствора NaCl и 9ч химически чистого глицерина).

Люминисцентная микроскопия

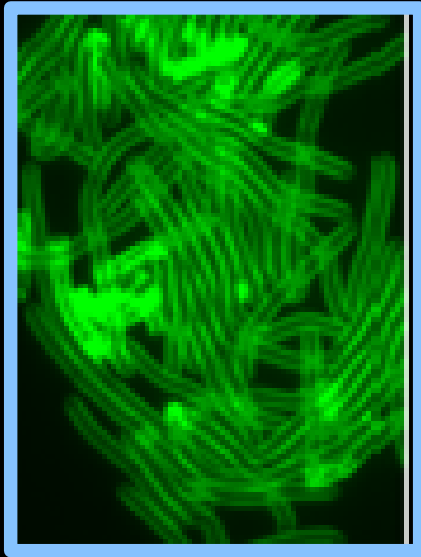
Учет результатов и их оценка

- Споры и вегетативные клетки *B. anthracis* , окрашенные люминесцирующими иммуноглобулинами, дают яркое свечение периферии клеток , имеющих характерную для данного вида морфологию . Такое свечение называется специфическим, в отличие от неспецифического, характеризующегося равномерным неярким свечением всей поверхности клеток

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;
- **++** или **+** – слабое свечение периферии клетки, не контрастирующее с ее телом.
- Свечение спор и вегетативных клеток на 4+ и 3+ позволяет подозревать наличие в исследуемом материале *B. anthracis* и может служить основанием для выдачи **предварительного положительного ответа.**

Оценки результатов люминесцентной микроскопии

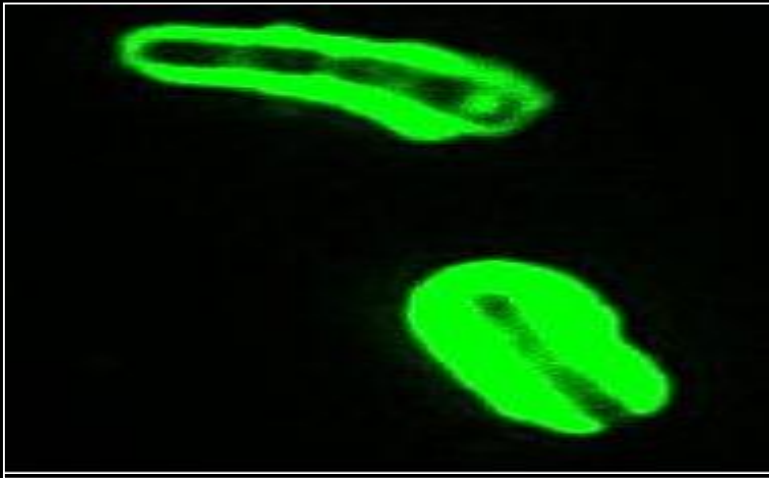


++++ – большое количество специфически светящихся клеток, очень яркая флуоресценция по периферии споры или вегетативной клетки, четко контрастирующая с темным телом клетки;

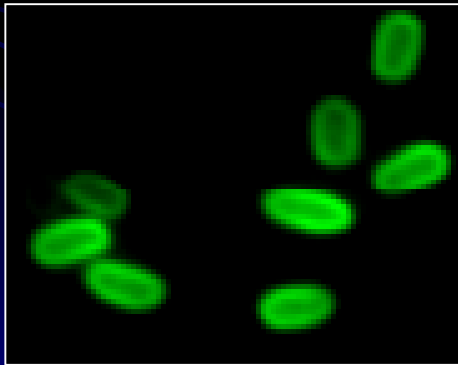
+++ – яркая флуоресценция периферии клеток, клетки расположены отдельными группами (цепочками) и единично;



Люминисцентная микроскопия



Капсульные клетки *B. anthracis*



Споры *B. anthracis*— окраска
сибирязвенной люминесцирующей
споровой адсорбированной сывороткой

Иммунно-серологические методы исследования

Реакция преципитации по Асколли

- Реакция позволяет в короткие сроки обнаружить сибиреязвенный антиген в экстрактах из струпьев язв больных, органов умерших от сибирской язвы людей, шкур и органов павших животных.
- Для постановки реакции необходимы:
преципитирующая сибиреязвенная сыворотка,
экстракт из исследуемого материала,
сибиреязвенный бактериальный антиген для
контроля.

Иммунно-серологические методы исследования

Реакция преципитации по Асколли

Получение экстракта

- Для получения экстракта из патологического и струпьев горячим способом материал измельчают, заливают 0,9 % раствором NaCl с 0,3 % карболовой кислоты в соотношении 1:10 и кипятят в течение 30-40 мин, при холодном способе – оставляют на 16-18 ч при комнатной температуре. Готовые экстракты фильтруют до полной прозрачности

Иммунно-серологические методы исследования

Постановка реакции преципитации по Асколли

1. **Опытная пробирка:** в узкую пробирку на дно вносят 0,2-0,3 мл преципитирующей сибирязвенной сыворотки, сверху осторожно наслаивают такое же количество экстракта пробы.
2. **Положительный контроль:** экстракт заменяется на стандартный сибирязвенный антиген.
3. **Отрицательный контроль:** экстракт заменяется на экстрагирующую жидкость.
4. **Отрицательный контроль:** Преципитирующая сыворотка заменяется на нормальную лошадиную сыворотку.

Иммунно-серологические методы исследования

Оценка результатов реакции преципитации по Асколли

1. 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.
2. Реакция оценивается как **сомнительная**, если кольцо преципитации в пробирке с исследуемой пробой появляется позднее, чем через 15 мин при адекватных положительном и отрицательных контролях.
3. Реакция оценивается как **отрицательная**, если кольцо преципитации не образуется при адекватных положительном и отрицательных контролях.

Иммунно-серологические методы исследования нМФА для выявления специфических антител в сыворотке крови

- Сыворотка диагностическая антивидовая против иммуноглобулинов человека люминесцирующая;
- Свежие фиксированные мазки из 18-20-часовой вегетативной культуры вакцинного штамма *B. anthracis* (взвесь соответствующая ОСО мутности 10 ед. ГИСК им. Л.А. Тарасевича). На каждом стекле по 8 мазков.
- Исследуемая сыворотка больного человека инактивированная на водяной бане при 56 °С в течение 20 минут;
- Сыворотка здорового человека (отрицат. контр.)

Иммунно-серологические методы исследования ИМФА для выявления специфических антител в сыворотке крови

Порядок выполнения

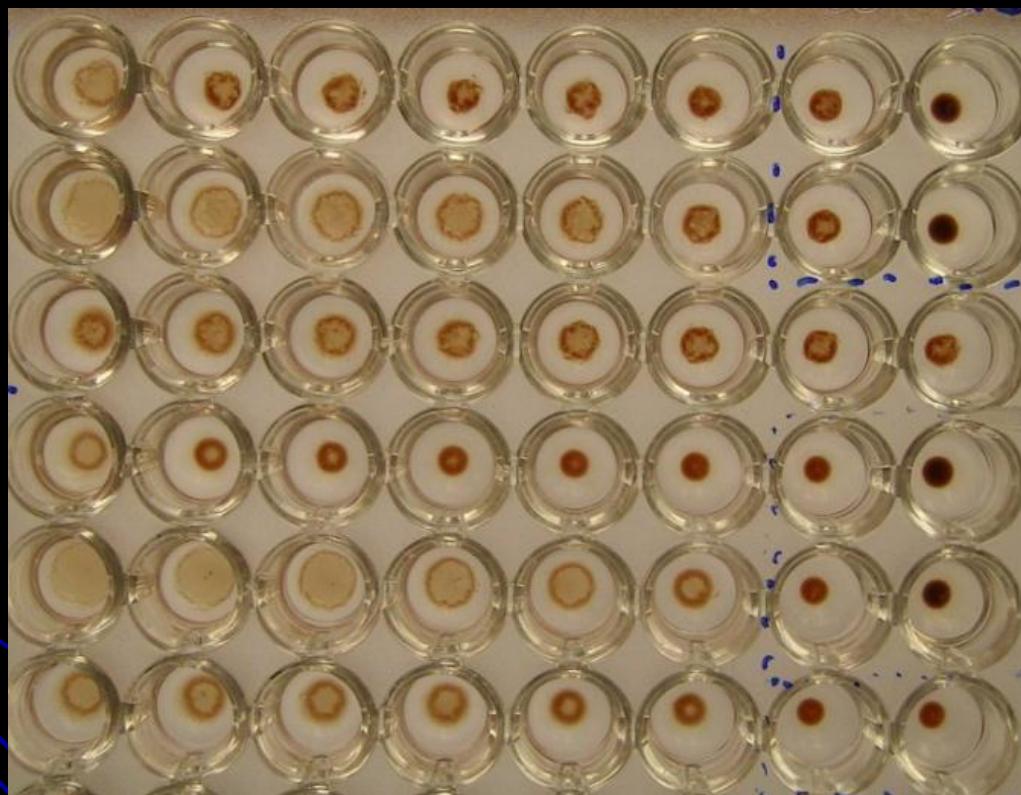
- **Исследуемую сыворотку титруют в 0,9 % растворе NaCl с двукратным шагом.**
- **На промаркированном стекле на каждый из 8 мазков наносят по 1 капле соответствующего разведения испытуемой сыворотки и выдерживают при 37 °С в течение 20-30 минут. Тщательно промывают 2 раза по 10 мин в забуференном 0,9 % растворе NaCl, и 10 мин в ДВ. Высушивают на воздухе.**

Иммунно-серологические методы исследования ИМФА для выявления специфических антител в сыворотке крови

Порядок выполнения

- На мазки наносят люминесцирующую сыворотку против иммуноглобулинов человека в рабочем титре. Окрашивают также, как и в предыдущем случае.
- Микроскопию проводят с иммерсионной системой.
- Положительным считаются результаты на **3+** и **4+**.
- В ИМФА **диагностическими считаются титры – 1:16-1:32 и 4-кратное нарастание титров при повторном исследовании.** Специфические антитела могут появляться с 5-х суток и нарастать до 21 суток.

Выявление антитоксических антител в РПГА



Иммунно-серологические методы исследования

Реакция непрямой гемагглютинации

- **Используется эритроцитарный иммуноглобулиновый диагностикум для выявления сибиреязвенных спор в объектах внешней среды. Исследование материала проводится согласно инструкции по применению.**
- 

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 у переболевших сибирской язвой может сохраняться длительное время, что позволяет использовать антраксин не только для диагноза текущего заболевания, но и для ретроспективной диагностики.

Кожно-аллергическая проба с сибиреязвенным аллергеном антраксином

Антраксин вводят с соблюдением всех правил асептики строго внутрикожно в количестве 0,1 мл в нижней трети левого предплечья на внутренней стороне. На месте инъекции должна образовываться беловатая, хорошо ограниченная папула около 0,8 см в диаметре, имеющая вдавление на месте волосяных мешочков. В месте введения антраксина через 24-48 ч учитывается наличие гиперемии и инфильтрата. В зависимости от размеров этих элементов производят оценку пробы, руководствуясь проведенной ниже шкалой.

Кожно-аллергическая проба с сибиреязвенным 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	Резкоположительная (+++)
Гиперемия более 40 мм в диаметре с инфильтратом	Гиперемия 8 мм в диаметре и более	Очень резкоположительная (++++)

Молекулярно-генетические методы исследования

«Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I – IV групп патогенности» Методические указания МУ 1.3.2569 -09, Москва, 2009 г.

Обеззараживание проб для исследования методом ПЦР проводят в два этапа: перевод спор в вегетативную форму и обработка лизирующим буфером, содержащим гуанидинтиоцианат.

Молекулярно-генетические методы исследования

Герминация спор и обработка вегетативных форм *B. anthracis* пенициллином. Предварительно подготовленный нативный материал в количестве 0,1 мл или одну бактериологическую петлю 18-ти часовой агаровой культуры подозрительных колоний засевают в стеклянные пробирки с 0,9 мл бульона Хоттингера рН 7,4 и инкубируют с аэрацией при $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 2,5 ч. После этого в пробирки добавляют пенициллин (до конечной концентрации 1000 ЕД/мл) и инкубируют с аэрацией 15 мин при $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Затем прогревают при $100 ^\circ\text{C}$ в течение 10 мин на водяной бане. Допускается прогревание проб, обработанных пенициллином, в твердотельном термостате при $100 ^\circ\text{C}$, для чего содержимое стеклянной пробирки переносят в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5-1,7 мл с завинчивающейся или защелкивающейся крышкой.

Молекулярно-генетические методы исследования

- **Обработка лизирующим буфером с гуанидинтиоцианатом.** После прогревания при 100 °С в течение 10 мин из пробирок отбирают по 0,1 мл материала и переносят в отдельные микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл с 300 мкл лизирующего раствора, содержащего 6 М гуанидинтиоцианата. Затем инкубируют при 65 °С в течение 15 мин.
- **Обработанные таким образом пробы считаются обеззараженными и всю последующую работу проводят как с незаразным материалом.**

Молекулярно-генетические методы исследования

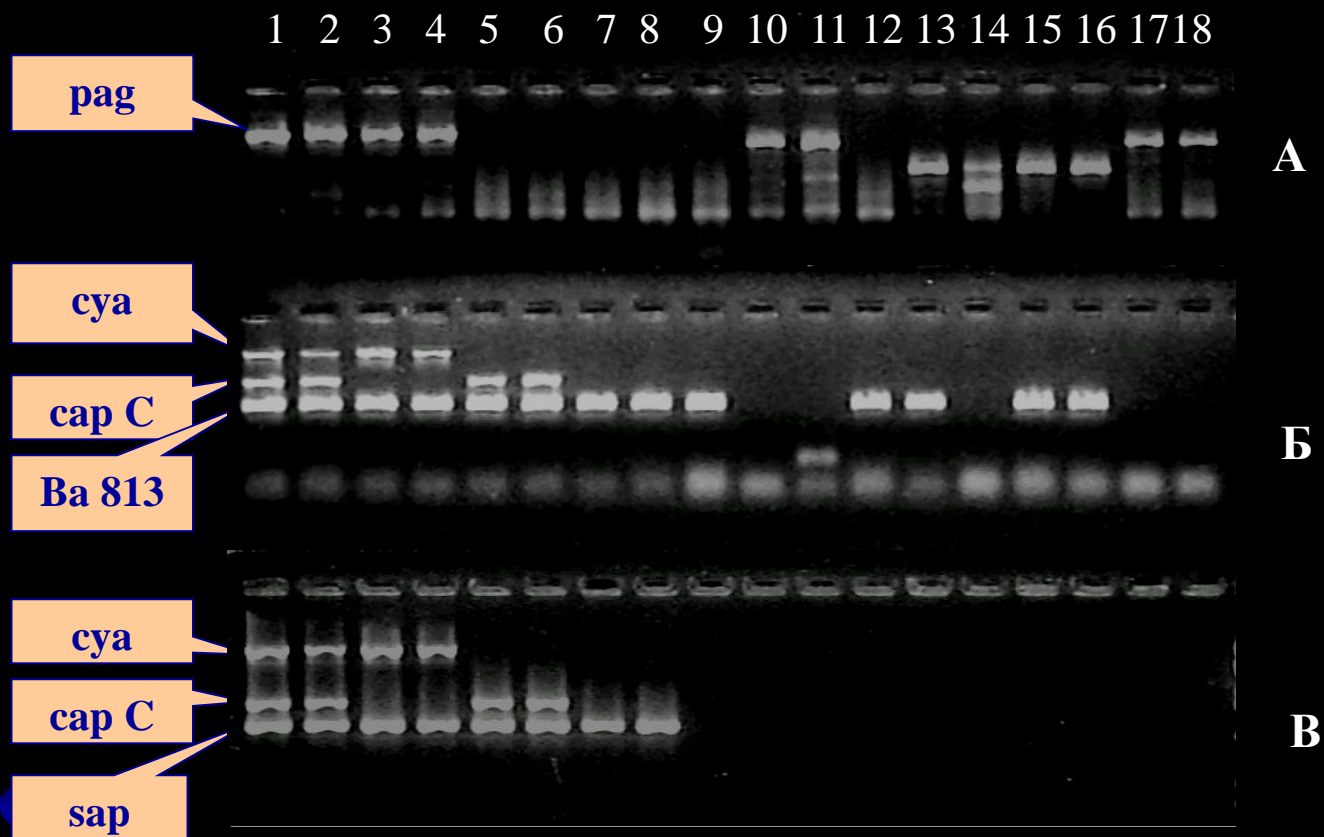
- Для выделения ДНК из исследуемых проб используют коммерческие наборы, содержащие 6 М гуанидинтиоционата. В основе лежит метод нуклеосорбции.
- Для проведения ПЦР с целью специфической индикации или идентификации *B. anthracis* используют тест-системы для выявления ДНК *B. anthracis*, разрешенные к 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».

Молекулярно-генетические методы исследования



Молекулярно-генетические методы исследования





А-тест-система производства РосНИПЧИ «Микроб», Б –
Ramisse V. et al.

В- предлагаемая тест-система; 1,2- В.а.pXO1pXO2;.3,4- В.а.
pXO2;5,6-pXO1;

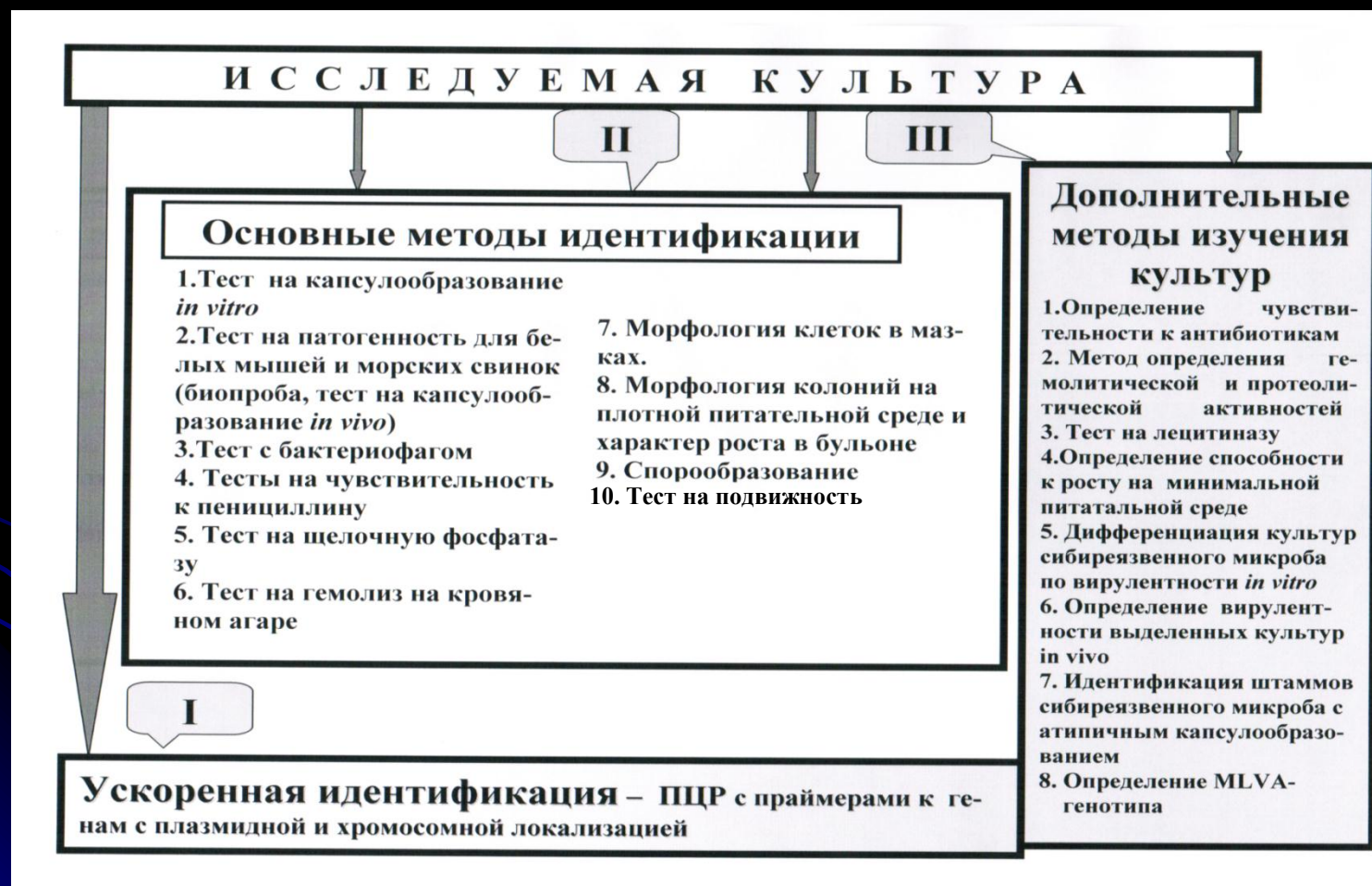
7,8- В.а. б/п; 9-18 – *Bacillus* spp.

Определение ДНК *B. anthracis* методом мультиплексной ПЦР в клиническом материале



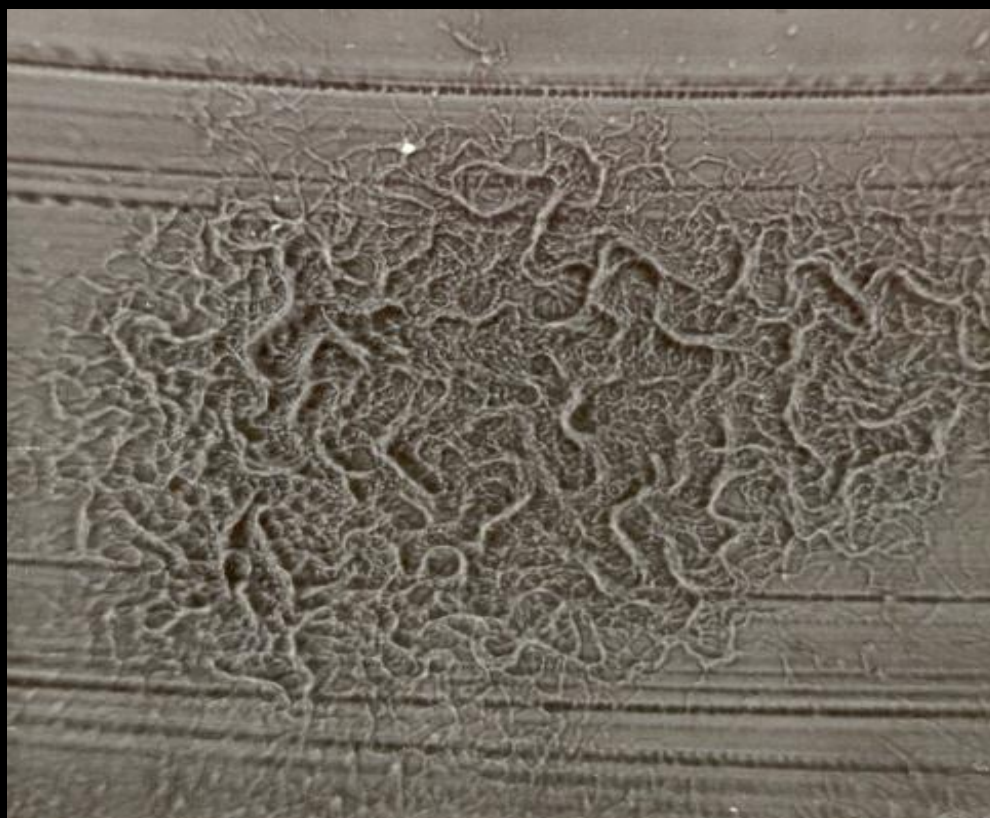
1 – Ladder 100; 2 – К+ (ДНК *B. anthracis* 81/1); 3 – ОКО; 4 – сыворотка крови больного №1; 5 – сыворотка крови больной №2; 6 – сыворотка крови больной №3; 7 – фрагмент струпа больного №1; 8 – фрагмент струпа больной №2; 9 – фрагмент струпа больной №3; 10 – содержимое везикулы больной №3.

Схема идентификации культур *Bacillus anthracis*



Основные методы идентификации

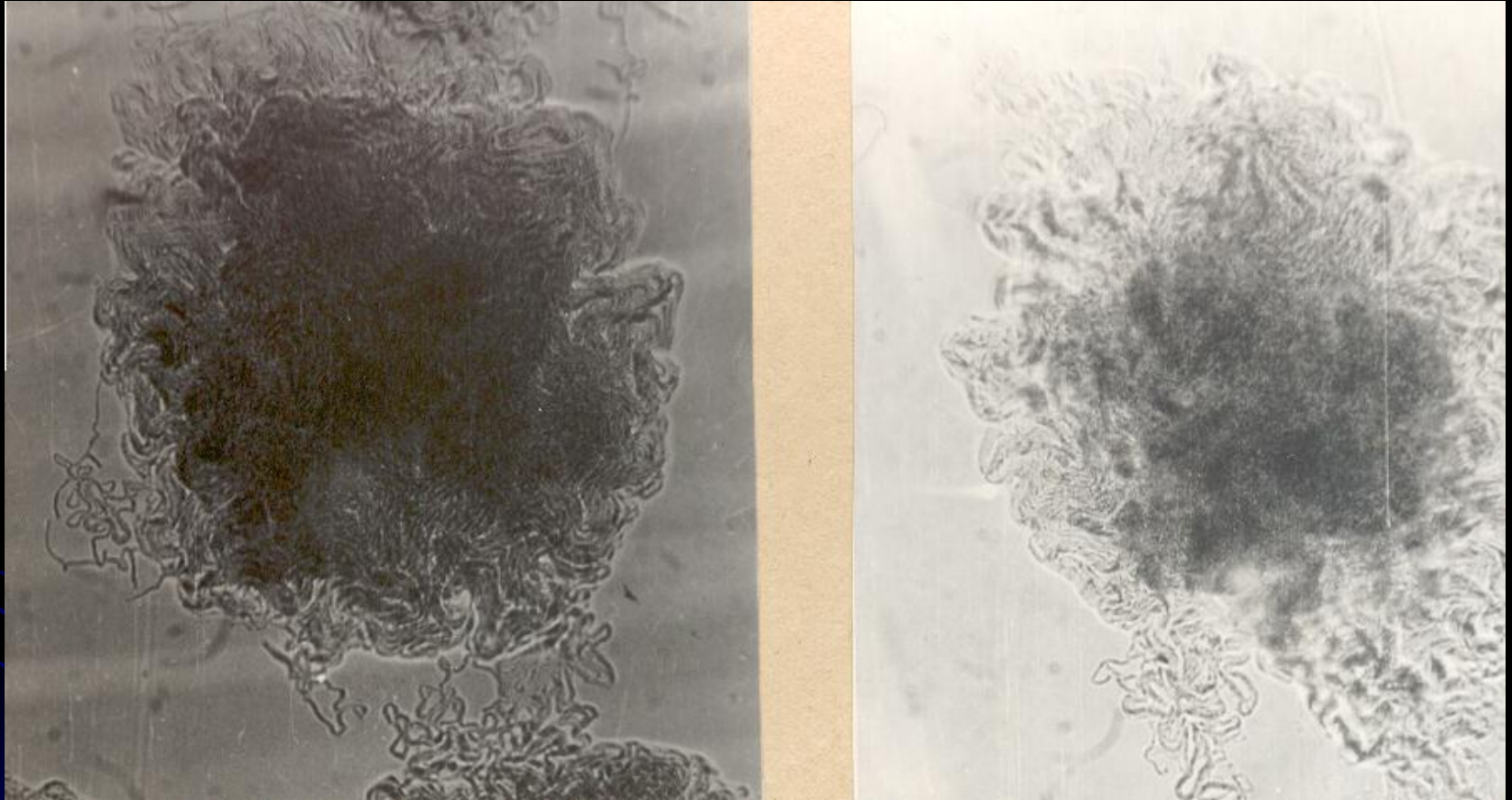
- Оценивают колонии по их морфологии: величине, форме, виду, цвету, характеру поверхности и края, прозрачности, структуре, консистенции, а также по специфическому запаху. На МПА и агаре Хоттингера возбудитель сибирской язвы формирует крупные шероховатые матовые серые сухие колонии в R-форме, с «шагреновой» поверхностью, неровными краями и отходящими от них волнистыми отростками, напоминающими при просмотре в микроскопе (малое увеличение) локоны волос или львиную гриву. Колонии сибиреязвенного микроба на плотных питательных средах отличаются от колоний спорообразующих сапрофитов меньшими размерами, большей шероховатостью и более выраженными «локонами».



**Начальный рост сибирезвенового микроба
на питательном агаре через 3-4 часа**



**Начальный рост сибирезвенного микроба
на питательном агаре через 8-12 часов**



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



**Формирование колоний сибиреязвенного микроба
на питательном агаре – через 24 часа**



**Формирование колоний сибирязвенного микроба
на питательном агаре – через 48 часа**

Край колоний *B. anthracis*

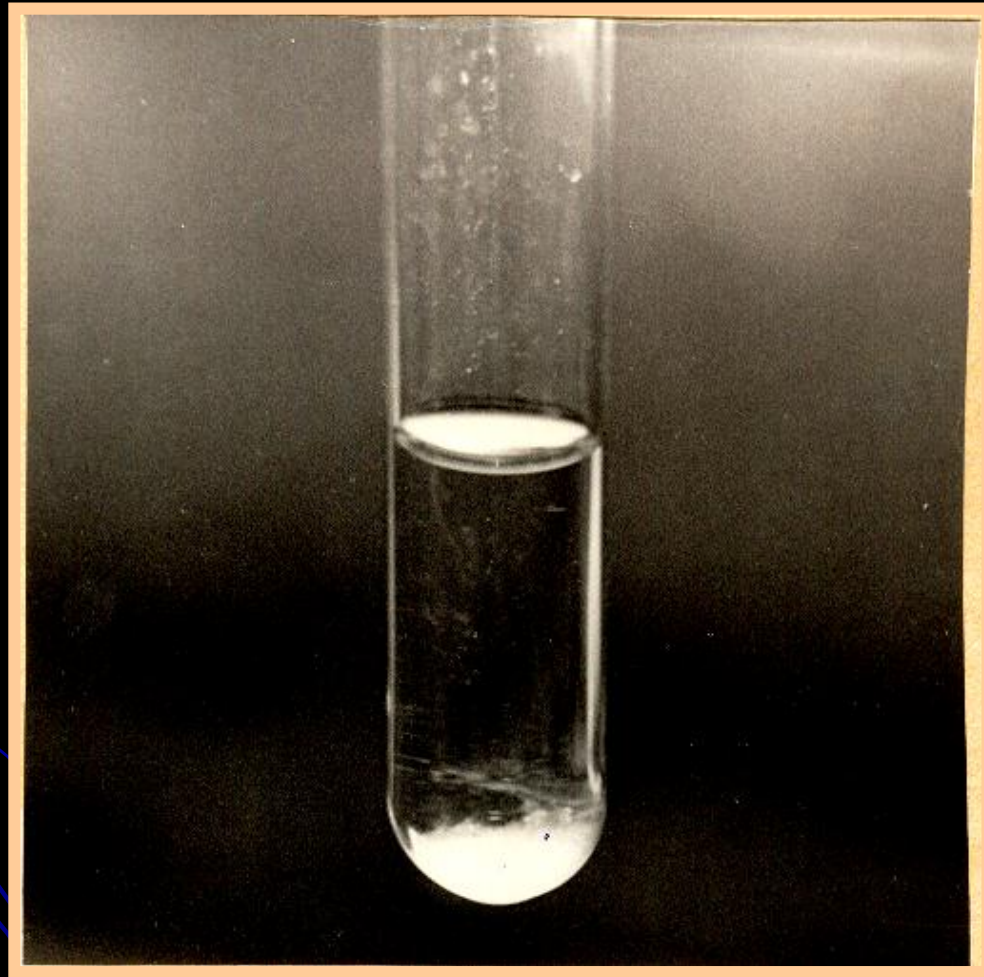


Основные методы идентификации

Характер роста на жидких питательных средах

- В МПБ сибиреязвенный микроб растет в виде придонного «комочка ваты», бульон над которым остается прозрачным. «Комочек ваты» бульонной культуры *B.anthraxis* с трудом разбивается при встряхивании, в отличие от подобного придонного роста некоторых представителей спорообразующих сапрофитов, легко разбивающегося и вызывающего помутнение среды.

Типичный рост *Bacillus anthracis* в бульоне
через 18-20 часов – «комочек ваты» на дне



Основные методы идентификации

Морфология

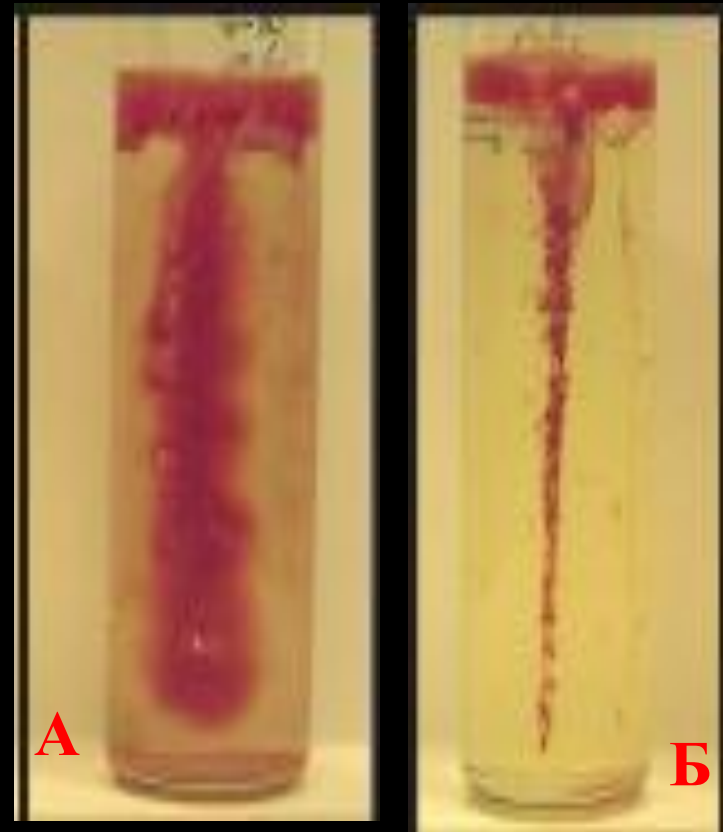
- В мазках из 18-24-часовых бульонных и агаровых культур вегетативные клетки имеют форму палочек, расположенных длинными цепочками. Концы бацилл в окрашенных препаратах обрублены и вогнуты, отчего цепочка напоминает бамбуковую трость с коленчатыми сочленениями. По Граму бациллы сибирской язвы окрашиваются положительно. Споры имеют овальную форму, внутри бактериальной клетки образуется одна спора, располагающаяся центрально, не превышая диаметра тела микробной клетки. Размеры вегетативных клеток сибиреязвенного микроба 1-1,5×6-10 мкм, спор - 0,8-1×1,5 мкм.

Основные методы идентификации

- Одним из наиболее постоянных для сибирезвального микроба признаков является **отсутствие подвижности** в отличие от большинства спорообразующих сапрофитов. Можно определить подвижность путем посева культуры уколом в столбик полужидкого (0,2-0,3 %) агара. Посевы выдерживают в термостате при температуре $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 18-20 ч. В полужидком агаре рост сибирезвального микроба наблюдается только по следу укола, а окружающая среда остается прозрачной. Подвижные микробы дают диффузный рост. Простым методом определения подвижности является микроскопическое исследование в «висячей» или раздавленной капле, а также в камере Горяева 18-20 часовой бульонной культуры. Однако описаны и неподвижные варианты *B. cereus* и других сапрофитов.

Основные методы идентификации

определение подвижности



А – подвижные культуры
Б – неподвижные культуры

Основные методы идентификации

- **Обнаружение капсулы *in vitro*** проводят посевом культур на 1% бикарбонатно-сывороточный агар или среду ГКИ. Инкубацию на 1% бикарбонатном агаре проводят при $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ в анаэроштатах при содержании 5-50% CO_2 или в эксикаторе с притертой крышкой. Просматривают посеы 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 сибирезвенной люминесцирующей сывороткой), видны цепочки палочек, окруженных хорошо выраженной капсулой.

Анаэробные статисты для культивирования посевов в условиях повышенного содержания углекислого газа



А- зарядка от баллона с углекислым газом, контроль по манометру;
Б- использование зарядного пакета и индикатора

Мукоидные колонии (SM-форма) *B. anthracis* на содовом агаре (10 % CO₂)



Основные методы идентификации

Обнаружение капсулы *in vivo*



Капсульные клетки *B. anthracis* в мазках-отпечатках из органов биопробных животных

Основные методы идентификации

- **Чувствительность к сибиреязвенным бактериофагам.**
Сибиреязвенный микроб лизируется сибиреязвенными фагами («Гамма», К, Фаh-ВНИИВВиМ и др.). Пробу с фагом ставят следующим образом. Чашки с агаром Хоттингера или МПА перед постановкой пробы подсушивают в термостате. Расчерчивают дно чашки снаружи на квадраты со стороной 2 см. Бактериологической петлей или пипеткой на каждый квадрат наносят каплю 5-6-часовой бульонной культуры сибиреязвенного микроба. Чашку с приоткрытой крышкой подсушивают 30 мин в термостате, а затем в центр подсохшей капли наносят петлей каплю цельного сибиреязвенного бактериофага.

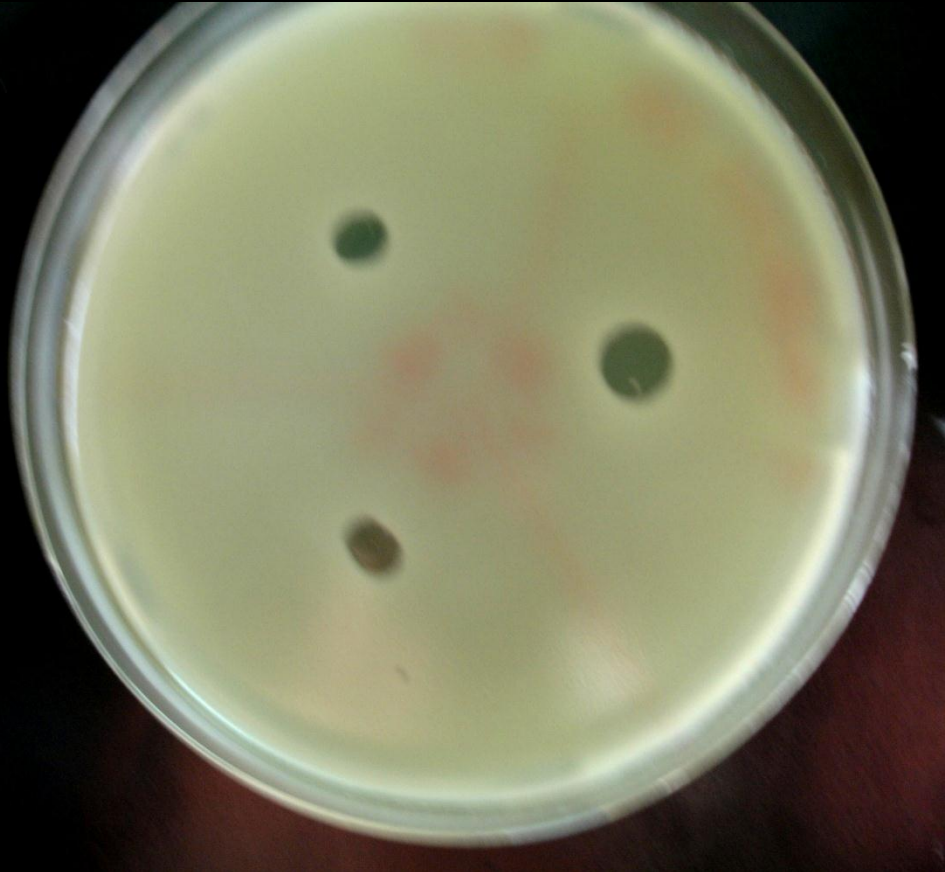
Основные методы идентификации

Чувствительность к сибиреязвенным бактериофагам.

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. В случае положительного результата на месте нанесения капли бактериофага наблюдается полное или частичное отсутствие роста в виде округлого просветления. Допускается постановка пробы с фагом методом стекающей капли в пробирках или чашках с агаром Хоттингера или МПА.

Основные методы идентификации

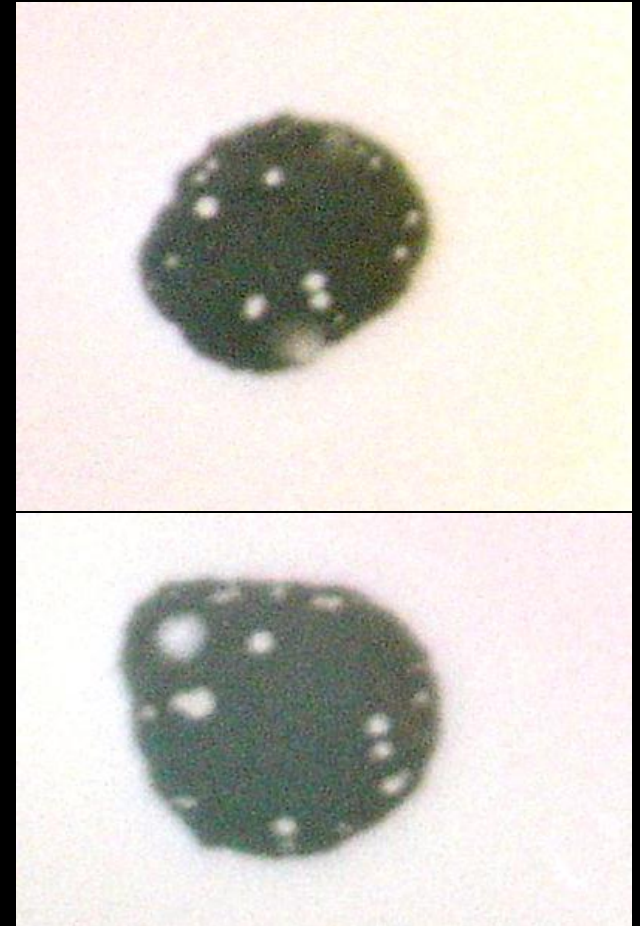
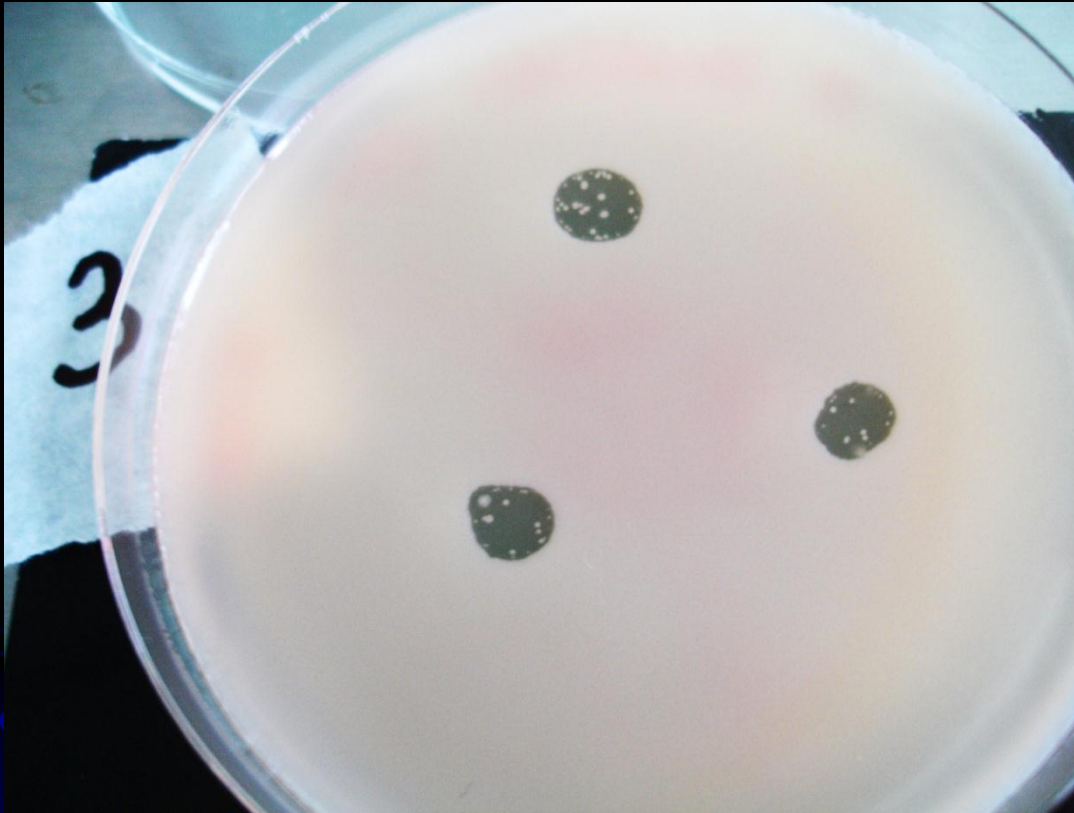
Чувствительность к сибиреязвенным бактериофагам.



Полный лизис культуры *B. anthracis* в месте нанесения бактериофага «Гамма» ++++ (положительная)

Основные методы идентификации

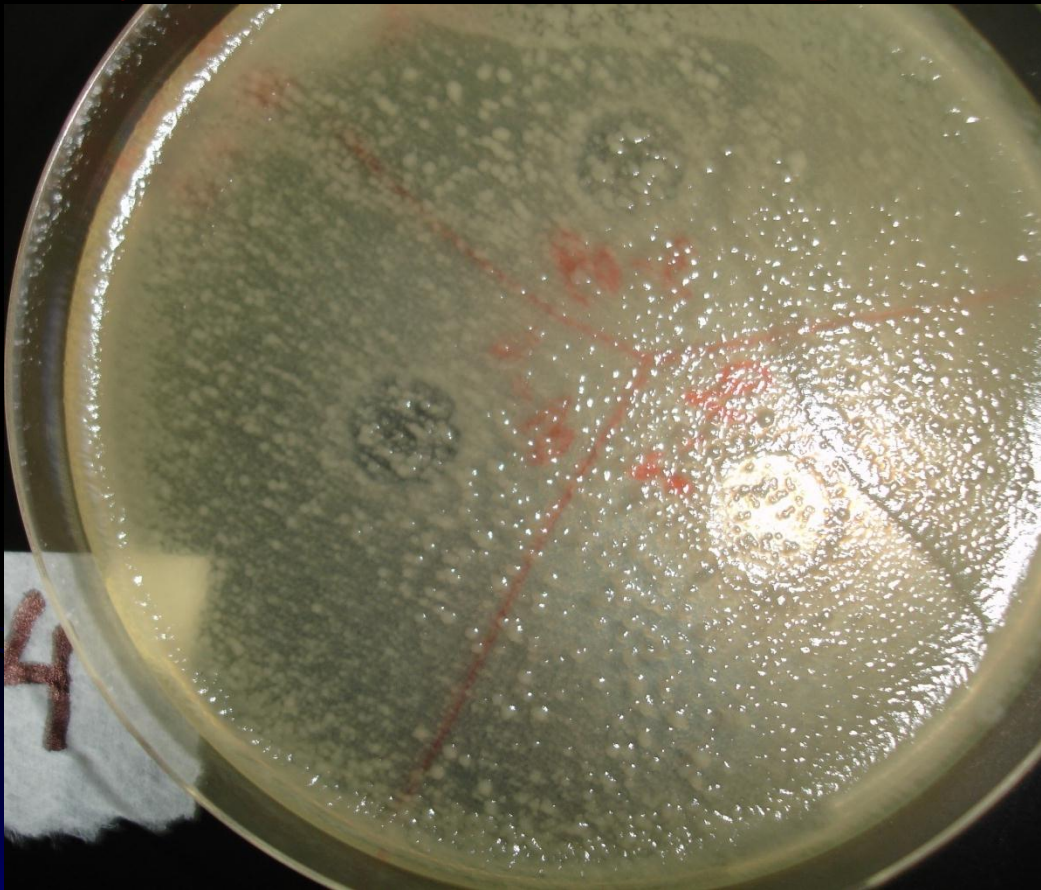
Чувствительность к сибиреязвенным бактериофагам.



Лизис культуры *B. anthracis* в месте нанесения бактериофага «Гамма» +++ (положительная)

Основные методы идентификации

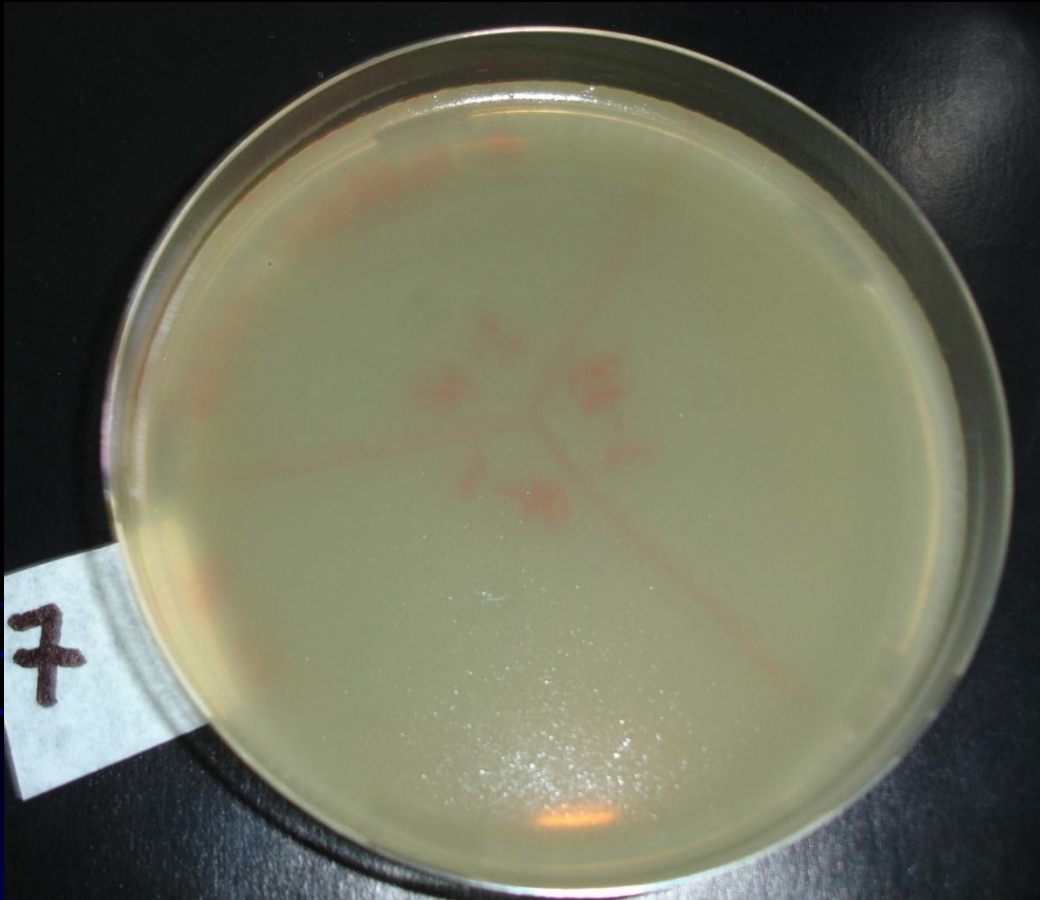
Чувствительность к сибиреязвенным бактериофагам.



Лизис культуры *B. anthracis* в месте нанесения бактериофага «Гамма» + (отрицательная)

Основные методы идентификации

Чувствительность к сибиреязвенным бактериофагам.



Лизис культуры *B. anthracis* в месте нанесения бактериофага «Гамма» - (отрицательная)

Иммуно-хроматографический метод регистрации нарастания титра фага «R/D-RH-6» с использованием «Тест-полосок V. anthracis +»

• Водяная баня

4. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Внимание! При использовании «Тест-полоска V.anthraxis ФАГ+» анализируемые образцы не подвергать автоклавированию и обработке формалином. Работу проводить с соблюдением СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I - II групп патогенности».

Исследуемую суспензию микробных клеток в концентрации $1,0 \times 10^6$ м.к./мл вносят в колбу с 50 мл ГРМ-бульона и подрашивают при аэрации (140-160 кач./мин.) в течение 2,5-3,0 часов при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Флакон с сибиреязвенным фагом вскрывают, предварительно обработав 70 % этиловым спиртом. Из ампулы с физиологическим раствором отбирают стерильным одноразовым шприцом 1 мл раствора и вносят во флакон с фагом. Затем готовят десятикратные разведения фага ГРМ-бульоном до конечной концентрации $1,0 \times 10^6$ фаг.ч./мл. В колбу с культивируемой микробной суспензией вносят 1 мл бактериофага с концентрацией $1,0 \times 10^6$ фаг.ч. /мл. Культивирование с фагом продолжают в течение 6-12 часов при тех же условиях. Полученный образец использовать по п. 4.1

4.1 АНАЛИЗ

Внимание: анализ проводится в двух повторах.

1. Извлечь необходимое количество упаковок теста из холодильника и выдержать при комнатной температуре 15 минут;
2. С помощью пипетки внести в круглодонную пробирку объемом 2 мл не менее 0,1 мл анализируемого образца;
3. Поместить в пробирку с анализируемым образцом «Тест-полоску V.anthraxis ФАГ+» концом, на котором указано направление и глубина погружения, так чтобы уровень взвеси не был выше этой отметки.

Иммуно-хроматографический метод регистрации нарастания титра фага «R/D-RH-6» с использованием «Тест-полосок B. anthracis +»

и глубина погружения, так чтобы уровень взошёл не выше...

5. РЕГИСТРАЦИЯ И УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

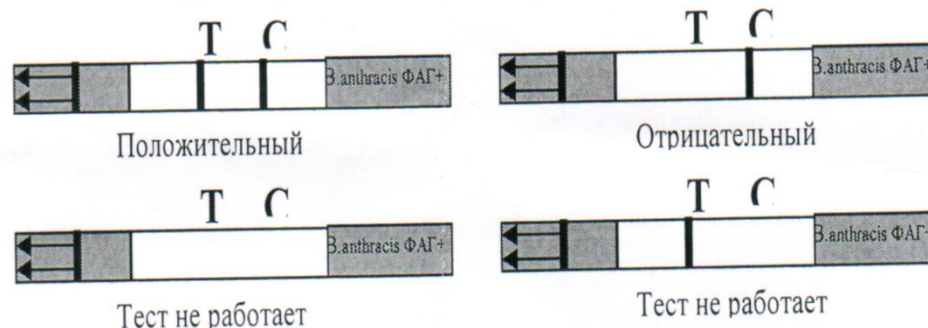
Учет результата провести через 15-20 минут. Смотри таблицу и иллюстрации интерпретации результатов.

Таблица интерпретации результатов.

Положительный результат	Наличие видимых глазом двух окрашенных линий
Отрицательный результат	Наличие окрашенной линии только в зоне удалённой от метки, указывающей направление и глубину погружения теста
Тест не работает	Отсутствие окрашенной линии в зоне удалённой от метки, указывающей направление и глубину погружения теста
Тест не работает	Полное отсутствие окрашенных линий

Внимание: Не следует учитывать интенсивность линий при интерпретации результата.

Иллюстрации к таблице интерпретации результатов:



Основные методы идентификации

- **Тест на гемолиз.** Для проведения этого теста готовят МПА или агар Хоттингера (рН 7,2) с 3-5 % дефибрированной крови барана. Посев испытуемых культур производят бактериологической петлей секторами и инкубируют в термостате при $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 18-20 ч, после чего учитывают результат. В эти сроки сибиреязвенный микроб не лизирует эритроциты барана в отличие от большинства родственных спорообразующих сапрофитов, образующих широкую зону гемолиза вокруг выросших колоний.

Основные методы идентификации

Тест на гемолиз



Культура *B. anthracis* на агаре с 5% дефибринированной крови барана

Основные методы идентификации

Тест «жемчужного ожерелья». Перед постановкой пробы остуженный до 45 °С 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 среды дно чашек снаружи размечают на квадраты или кружки, на которых пишут номера анализа. На обозначенные участки наносят по одной капле изучаемых 3-6-часовых бульонных культур. На одной чашке может быть поставлено до 10 проб. Посевы инкубируют при (36 ± 1) °С.

Основные методы идентификации

- Тест «жемчужного ожерелья».** Не позже 3 ч просматривают рост под микроскопом с иммерсионным объективом, предварительно накрыв каждый отмеченный участок покровным стеклом. На среде, содержащей пенициллин, видны шарообразной формы бактериальные клетки сибиреязвенного микроба, расположенных в виде цепочек, напоминающих ожерелье из жемчуга.
- Спорообразующие сапрофиты, как правило, устойчивые к пенициллину, имеют обычную бациллярную форму. В контрольной среде без пенициллина сибиреязвенный микроб формирует длинные цепи палочек.

Основные методы идентификации

Тест на «жемчужного ожерелья»



Сферопласты *B. anthracis* после инкубации на агаре с пенициллином

Основные методы идентификации

- **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 ± 1) °С. Затем делают мазки, их фиксируют и окрашивают по Ребигеру или метиленовой синькой.

Дополнительные методы изучения выделенных культур

- **Определение чувствительности к антибиотикам.** Готовят взвесь микробов в 0,9 % растворе NaCl, в соответствии ОСО мутности 10 ед. ГИСК им. Л.А. Тарасевича. Наносят в объеме 0,3 мл на поверхность питательной среды Мюллера-Хинтона или АГВ и распределяют шпателем. Чашки выдерживают 15 мин при комнатной температуре для впитывания жидкости. Накладывают пинцетом на поверхность засеянной питательной среды диски на одинаковом расстоянии, отступив 2 см от стенки чашки (не более 4 дисков), выдерживают 15 мин при комнатной температуре, а затем, перевернув их вверх дном, инкубируют при 36 °С в течение 18-20 ч (не более).

Дополнительные методы изучения выделенных культур

- **Определение чувствительности к антибиотикам.** Измеряют диаметр зон задержки роста вокруг дисков, включая диаметр самого диска, с точностью до 1 мм. Мелкие колонии в пределах зоны задержки роста не учитывают. При расплывчатых краях зоны или при зонах с двойными контурами измеряют диаметр зоны по наиболее четкой границе.
-

Дополнительные методы изучения выделенных культур

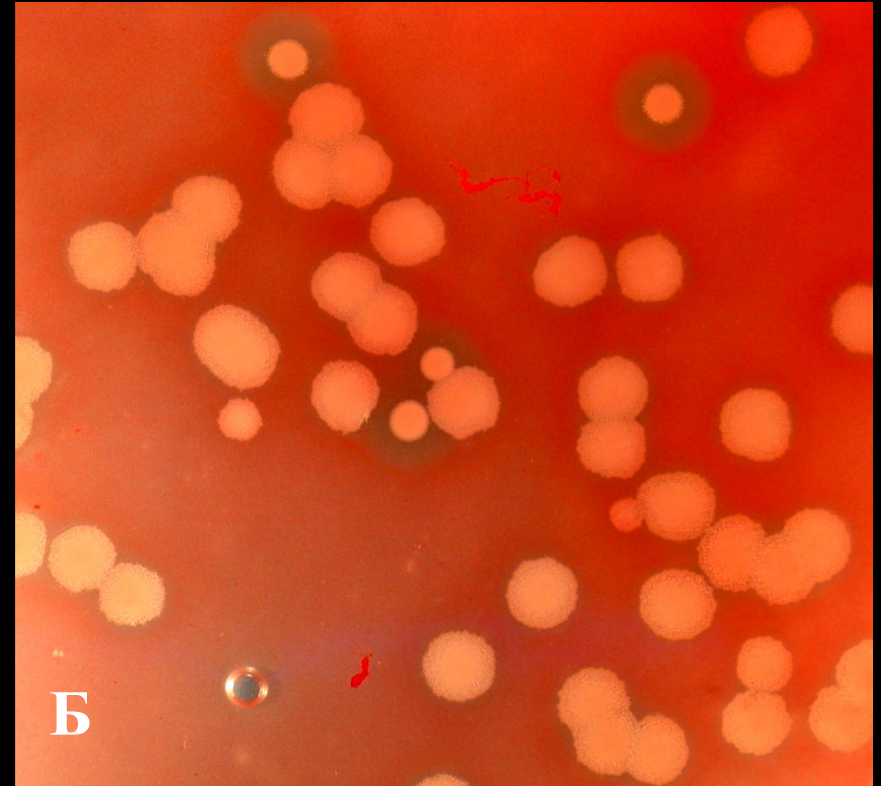
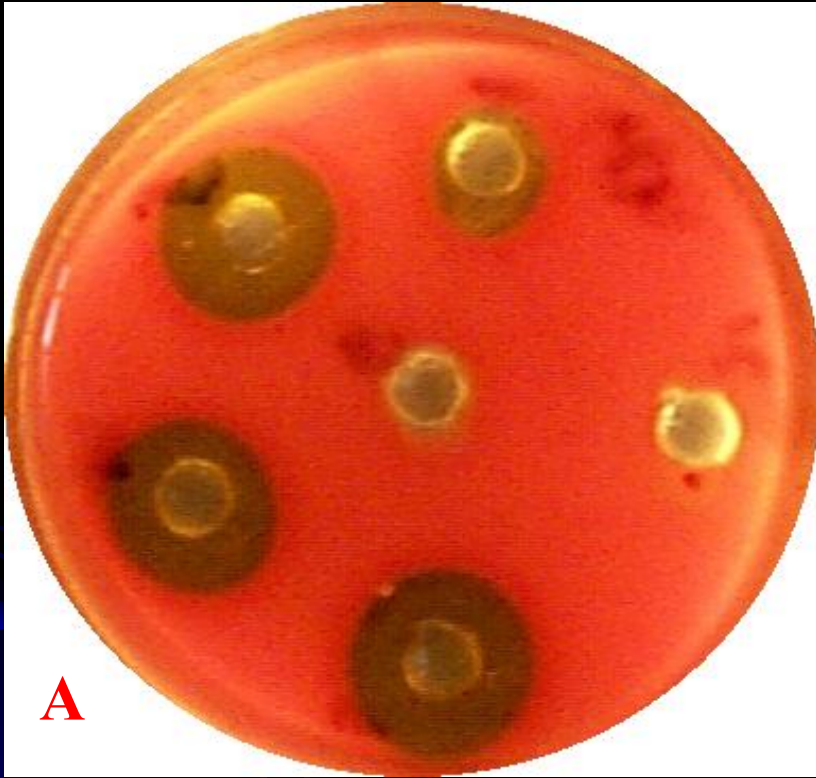
Определение чувствительности к антибиотикам методом серийных разведений. Используют суспензию той же концентрации микробных клеток, нанося её небольшими каплями с помощью репликатора или пипеткой с тонким концом на агаровые пластинки среды Мюллера-Хинтона или АГВ с различными концентрациями антибактериальных препаратов, начиная с чашек с минимальным содержанием антибиотиков. Посевы инкубируют 18-24 ч при температуре 36 °С. Чувствительность/устойчивость культур определяют по минимальной подавляющей концентрации (МПК, мг/л или мкг/мл) препарата, угнетающей рост возбудителя на среде культивирования.

Дополнительные методы изучения выделенных культур

Интерпретацию результатов определения чувствительности к антибиотикам проводят путем их сопоставления с пограничными значениями МПК и диаметров зон подавления роста возбудителя (см. табл. приложения 3). В таблице даны пограничные значения МПК и зон подавления роста для чувствительных и устойчивых культур. Между этими показателями находятся значения для культур с промежуточной устойчивостью. Необходимо учитывать результаты определения МПК и зон подавления роста для контрольных штаммов *B. anthracis* СТИ и *Staphylococcus aureus* АТСС 25923 на данной серии питательной среды.

Дополнительные методы изучения выделенных культур

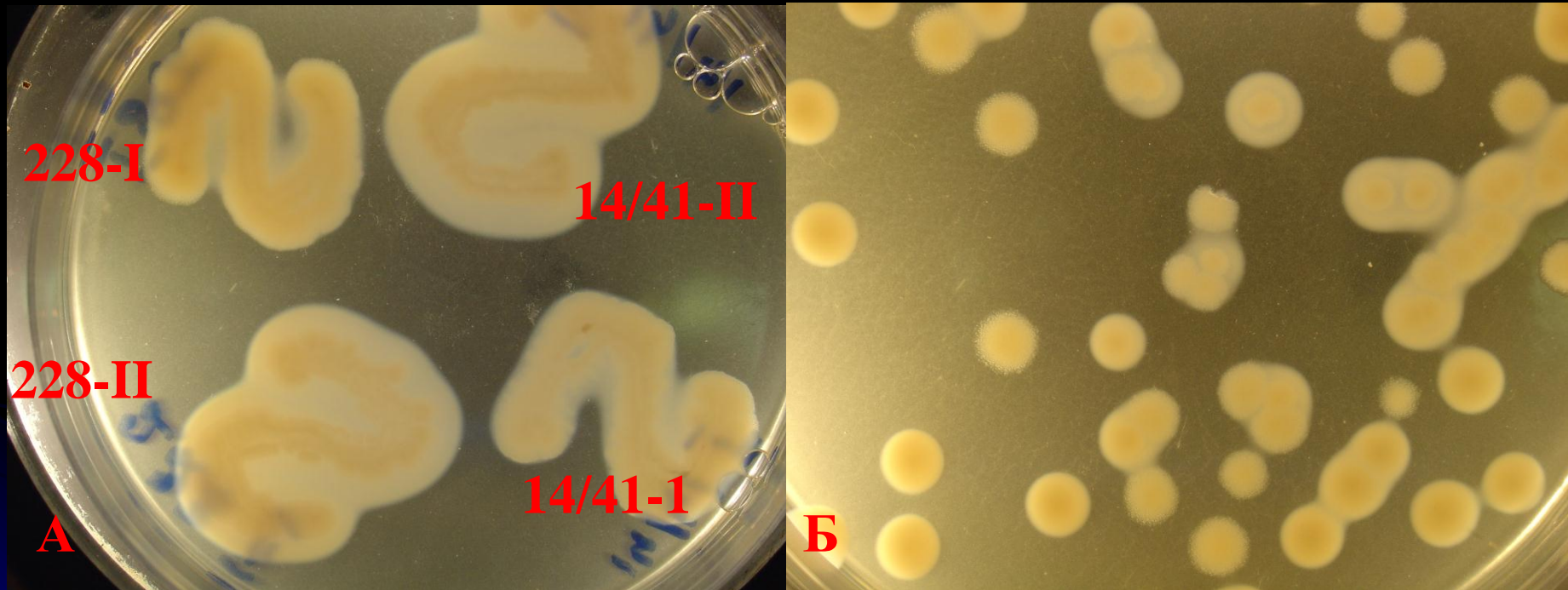
Изучение гемолитической активности



А – методом диффузии в двухслойный агар с отмытыми эритроцитами барана,

Б – методом посева на питательный двухслойный агар с отмытыми эритроцитами человека

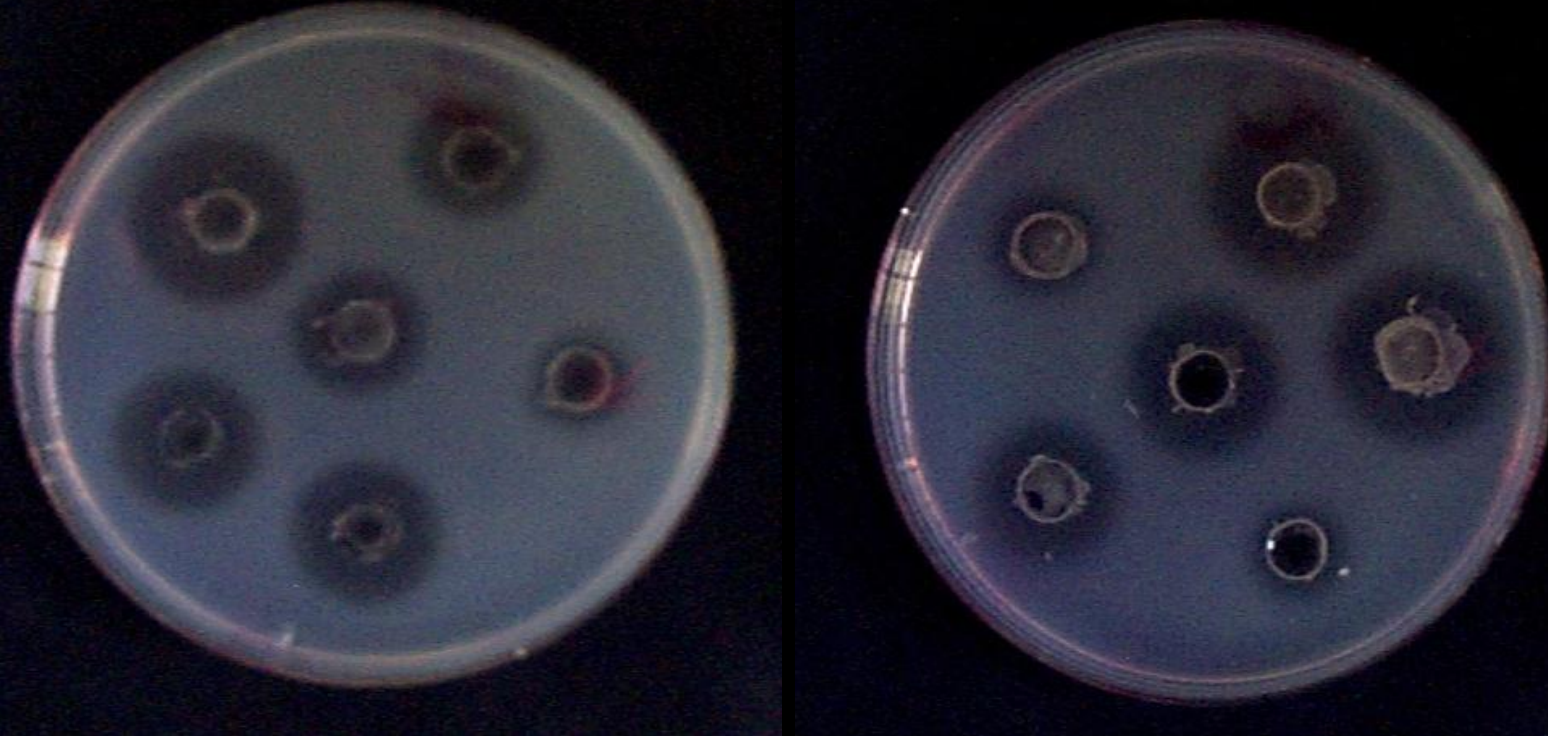
Дополнительные методы изучения выделенных культур Изучение лецитиназной активности



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

Дополнительные методы изучения выделенных культур

Изучение протеолитической активности



Зоны лизиса белковых субстратов вокруг лунок с культурами протеолитически активных штаммов *B. anthracis* двухслойных агаровых пластинах с белками после обработки трихлоруксусной кислотой

Дополнительные методы изучения выделенных культур

Определение способности к росту на минимальной питательной среде. Для этого готовят минимальную питательную среду «9 АТ». Споры изучаемых штаммов засевают на среду «9АТ» и выращивают в течение 24 - 48 ч при температуре (36 ± 1) °С. Для контроля засевают на эту среду споры *B. anthracis* 81/1. Если исследуемые штаммы не растут на этой среде через 48 ч, то их можно считать нуждающимися в дополнительных факторах роста.

Дифференциация культур сибиреязвенного микроба по вирулентности *in vitro*.

Предлагаемый метод дифференциации культур сибиреязвенного микроба по вирулентности *in vitro* основан на объективной регистрации различий в продукции разными культурами капсулы и экзотоксина при культивировании на агаре Хоттингера в воздушной атмосфере и на среде «СОПЭК», в атмосфере, обогащенной CO₂. Капсулообразование регистрируется по характерному росту на плотных средах в виде гладких слизистых колоний, в мазках из которых при микроскопии обнаруживаются капсульные бациллы. Учет токсинообразования ведется по визуально наблюдаемым концентрическим ореолам иммунопреципитации в среде вокруг колоний, продуцирующих токсин.

Дополнительные методы изучения выделенных культур

Штаммы относят:

1. к высоковирулентным, если они продуцируют капсулу и токсин в атмосфере CO_2 и не продуцируют капсулу на воздухе;
2. к умеренно вирулентным, если они не продуцируют токсин, продуцируют капсулу в атмосфере CO_2 и не продуцируют капсулу на воздухе;
3. к слабовирулентным, если они не продуцируют токсин, продуцируют капсулу в атмосфере CO_2 и на воздухе;
4. к авирулентным, если они продуцируют токсин, но не продуцируют капсулу;
5. к апатогенным, если не они не продуцируют ни капсулу, ни токсин.

Дополнительные методы изучения выделенных культур

Определение вирулентности выделенных культур *in vivo*.

Вирулентность выделенных культур сибиреязвенного микроба определяют двумя методами: вычислением DCL или LD₅₀.

Для определения LD₅₀ чаще всего используют белых беспородных мышей весом 18-20 г. Споровые взвеси, содержащие 1, 10, 100, 1000 и 10000 спор, вводят подкожно в объеме 0,5 мл, используя 4-6 животных на каждую дозу. За зараженными животными наблюдают в течение 10 сут, отмечают в каждой группе павших от сибиреязвенной инфекции животных. Статистическую обработку полученных результатов проводят по методу Рида и Менча или Кербера.

Дополнительные методы изучения выделенных культур

Определение вирулентности выделенных культур *in vivo*.

Для определения DCL используют морских свинок, кроликов и три заражающие дозы - 100, 1000 и 10000 спор. Каждой дозой инфицируют не менее трех животных. Наблюдение за ними проводят до 10 сут. Из органов павших животных делают мазки-отпечатки для бактериоскопии и посева на соответствующие питательные среды для установления специфичности гибели животных.

Культуры возбудителя сибирской язвы считаются вирулентными, если значение LD₅₀ для белых мышей и морских свинок или DCL для кроликов не превышают 10000 спор.

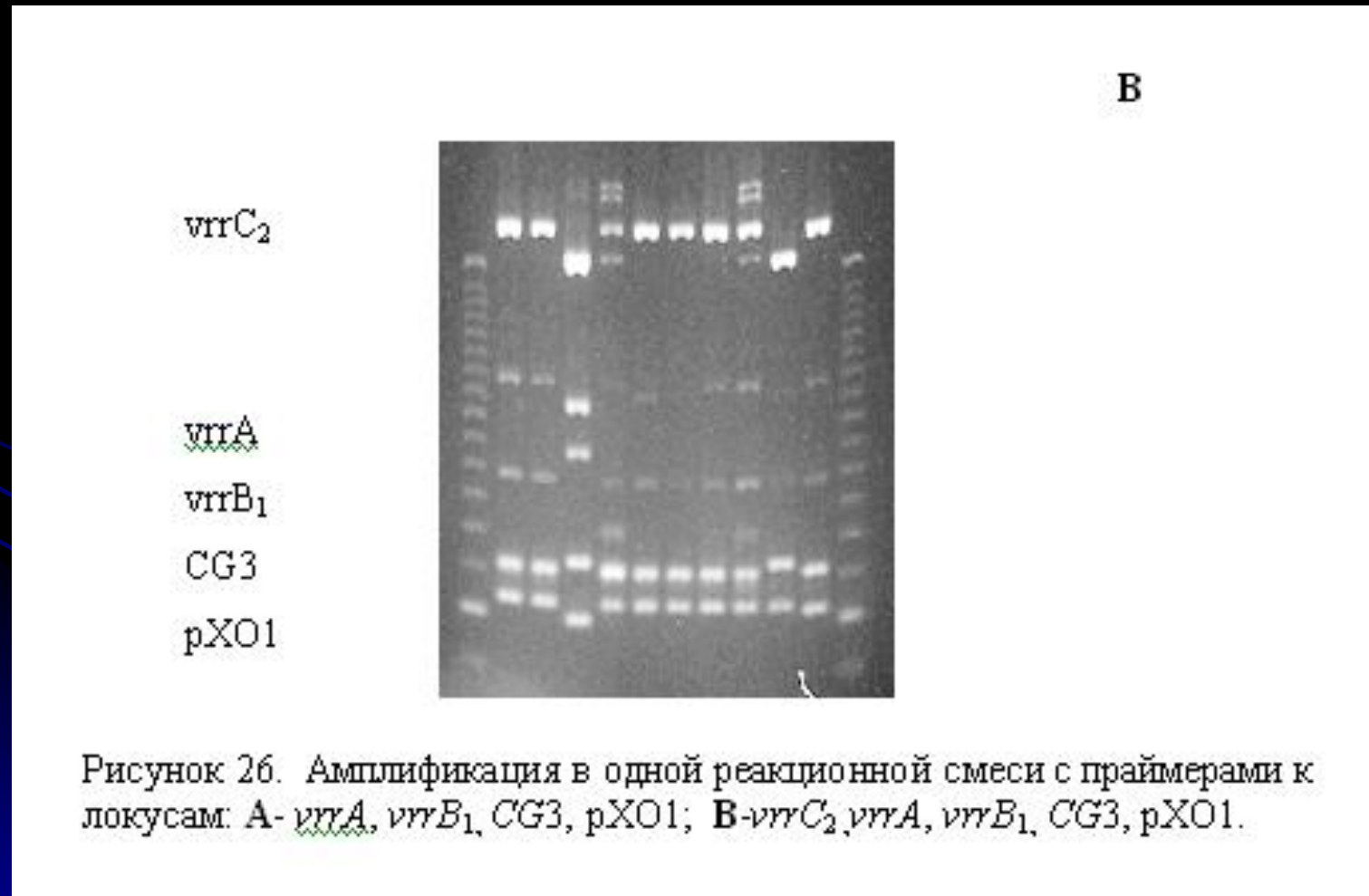
Дополнительные методы изучения выделенных культур

Определение MLVA-генотипа штаммов сибиреязвенного микроба.

Определение MLVA-генотипа культур 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.

Дополнительные методы изучения выделенных культур

Определение MLVA-генотипа штаммов сибирезвального микроба.

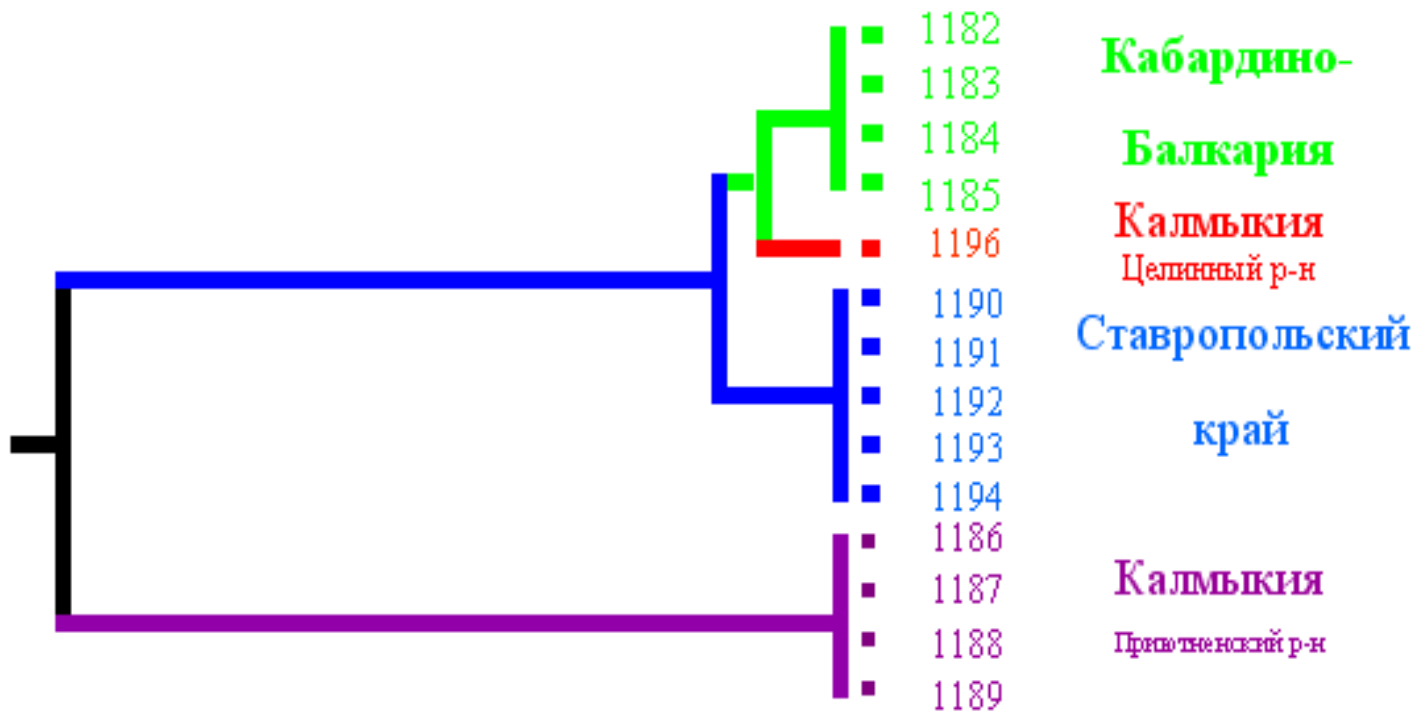


География вспышек сибирской язвы, ЮФО, 1998



Дополнительные методы изучения выделенных культур

Определение MLVA-генотипа штаммов сибирязвенного микроба.



Предварительные результаты специфической индикации

- *При исследовании патологического материала от людей и животных.*
- через 2-6 ч, по результатам микроскопии и МФА с капсульно-соматической люминесцирующей сывороткой;
- через 8-12 ч, по результатам ПЦР;
- через 2-6 ч, по результатам реакции преципитации по Асколи.
- *При исследовании секционного материала от трупов людей и животных, а также кож, шкур, шерсти, мяса и мясопродуктов:*
- через 2-6 ч, по результатам реакции преципитации по Асколи;
- через 2-6 ч, по результатам МФА с антиспоровой люминесцирующей сывороткой;
- через 8-12, по результатам ПЦР.
- *При исследовании материала из объектов внешней среды:*
- через 2-6 ч, по результатам МФА с антиспоровой люминесцирующей сывороткой;
- через 2-6 ч, по результатам РНГА
- через 8-12 ч, по результатам ПЦР.

Окончательные результаты специфической индикации

- *При исследовании любого материала, подозрительного на зараженность возбудителем сибирской язвы, через 48 ч на основании:*
- результатов ПЦР с материалом из типичных колоний;
- результатов МФА при окраске люминесцирующей соматической сибиреязвенной сывороткой культуры из типичных колоний.

Окончательные результаты полного лабораторного анализа

При исследовании любого материала, подозрительного на зараженность возбудителем сибирской язвы, через 2-10 сут на основании:

- морфологии колоний на питательных средах, в том числе и дифференциально-диагностической, и характера роста в МПБ;
- морфологии в мазках из выросших подозрительных колоний, МПБ;
- патологоанатомической картины у забитых на 2-3 сутки или павших белых мышей, обнаружения капсулы в мазках-отпечатках из органов биопробных животных и морфологии колоний при посеве органов на питательном агаре;
- характера роста колоний на 1% бикарбонатно-сывороточном агаре и морфологии клеток в мазках, приготовленных из колоний или взвеси микробов, выросших на жидкой среде ГКИ;

Окончательные результаты полного лабораторного анализа

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

Критерии постановки диагноза у людей

Диагноз сибирской язвы у человека считают установленным при наличии соответствующей клинической картины, эпидемиологического анамнеза, подтвержденных одним из нижеперечисленных способов:

- - 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 антраксовая проба.