

Микробиология сибирской язвы



Патогенность для различных видов животных и человека

Возбудитель сибирской язвы 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, гиппопотамов, носорогов, слонов, буйволов, бизонов, описаны заболевания норок на фермах. Иногда болеют даже страусы.

Патогенность для различных видов животных и человека

Все приматы чувствительны к сибирской язве и близки по восприимчивости к человеку. Считают, что в зависимости от пути заражения заражающая доза для человека составляет 10 спор при подкожном заражении, около 20000 спор при ингаляционном заражении, и $1,25 \times 10^7$ спор при пероральном заражении, однако возможно развитие инфекции и при меньших дозах, если имеется иммунодефицит. В зависимости от путей заражения у человека развивается кожная или висцеральная (кишечная, легочная) формы сибирской язвы. Любая из этих форм может приводить к развитию сепсиса и осложняться сибиреязвенным менингитом (генерализованная форма).

Определение вирулентности выделенных культур in vivo.

Вирулентность выделенных культур сибиреязвенного микроба in vivo определяют двумя методами: вычислением безусловно смертельной дозы (DCL) или 50 % летальной дозы (LD_{50}). Для заражения животных используют споровую взвесь. Для определения LD_{50} 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 и проводят статистическую обработку полученных результатов.

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. Культуры возбудителя сибирской язвы считаются вирулентными, если значение LD_{50} для белых мышей и морских свинок или DCL для кроликов не превышают 10000 спор.

Определение вирулентности выделенных культур *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 для сочетанного определения продукции экзотоксина и капсулы «СОПЭК» в атмосфере, обогащенной CO_2 . Капсулообразование регистрируется по характерному росту на плотных средах в виде гладких слизистых колоний, в мазках из которых при микроскопии обнаруживаются капсульные бациллы.

Тест на патогенность - определение вирулентности штаммов

Определение вирулентности выделенных культур *in vitro*.

Учет токсинообразования ведется по визуально наблюдаемым концентрическим ореолам иммунопреципитации в среде вокруг колоний, продуцирующих токсин. Иммунопреципитация в данном методе является следствием взаимодействия антитоксических антител противосибиреязвенного глобулина, введенного в состав среды, и диффундирующих в среду компонентов токсина, который синтезируется сибиреязвенным микробом при культивировании на среде в атмосфере с повышенным содержанием CO_2 . Все это позволяет дифференцировать культуры с обычной, то есть CO_2 -зависимой, CO_2 -независимой продукцией капсулы, бескапсульные, продуцирующие и не продуцирующие токсин. Среди них выделяют пять групп, в зависимости от характера экспрессии капсулы и токсина, которым соответствуют следующие степени патогенности: высоковирулентные, умеренно вирулентные, слабовирулентные, авирулентные и апатогенные.

Факторы патогенности

Что же определяет патогенность сибиреязвенного микроба?

1. Капсула

Со времени открытия сибиреязвенного микроба считалось, что капсула, образуемая по периферии клеточной стенки, выполняет антифагоцитарную функцию, способствуя выживанию *in vivo*.

Капсула маскирует *B.anthraxis* от иммунного контроля и позволяет ему беспрепятственно размножаться в организме хозяина. Недавно было установлено, что капсула связывается с летальным токсином в крови экспериментально инфицированных животных.

Установлено, что капсульное вещество – глутамтамилполипептид – активирует макрофаги линии THP-1 и дендритные клетки человека, приводя к продукции провоспалительного цитокина IL1.

Факторы патогенности

Таким образом, исследования последних лет показали, что функция капсулы сибиреязвенного микроба в патогенезе инфекции не ограничивается только защитой от фагоцитоза. Наличие соответствующего генетического аппарата и тонкая регуляция капсулообразования позволяют микробу, вероятно, на разных стадиях развития, использовать высокополимерную капсулу как антифагоцитарный компонент патогенности, а продукт ее деполимеризации для угнетения иных иммунных механизмов. Кроме того, взаимодействие капсулы с летальным токсином сибиреязвенного микроба увеличивает его токсическое действие, а воздействие на макрофаги приводит к запуску воспалительных иммунных реакций. Представляется, что использование ферментов, разрушающих капсулу *B. anthracis*, может быть средством терапии сибирской язвы.

Факторы патогенности

2. Экзотоксины

Летальная инфекция *B. anthracis* реализуется посредством действия двух экзотоксинов, летального токсина (ЛТ) и отежного токсина (ОТ).

Механизм патогенетического действия (ЛТ) многогранен. В частности, в соответствии с одной из теорий, в основе действия ЛТ лежит «окислительный взрыв» макрофагов. Высокие уровни токсина вызывают цитолиз макрофагов, низкие уровни стимулируют продукцию этими клетками цитокинов (интерлейкина-1 бета и фактора некроза опухоли альфа), которые индуцируют системный шок и гибель. Обработка высокими дозами токсина приводит к освобождению супероксид-аниона, что коррелирует с началом цитолиза. Цитолитическое действие ЛТ опосредуется интермедиатами окислительных реагентов, поскольку антиоксиданты частично защищают от интоксикации. Фагоцитарная активность макрофагов угнетается сублитическими концентрациями летального токсина.

Факторы патогенности

Сублитические количества ЛТ запускают каскад внутриклеточных событий, типичных для апоптоза, включая изменение проницаемости мембран, утрату митохондриального мембранного потенциала и фрагментацию ДНК.

Центральным признаком токсичности ЛТ является нарушение ключевых клеточных барьеров, поддерживающих гомеостаз.

В сочетании с хорошо известными иммуносупрессивными эффектами ЛТ, нарушение кишечного барьера обеспечивает потенциальный механизм инвазии хозяина энтеральным путем, через обычные входные ворота в течение естественного инфекционного цикла *B. anthracis*.

Поступление ОТ в клетки повышает внутриклеточные концентрации циклического АМФ, тем самым угнетая или активируя функции клеток хозяина. Обнаружены и другие последствия действия ОТ *in vivo*.

Все больше свидетельств указывают на то, что оба главных токсина *B. anthracis* могут вызывать существенную дисфункцию сердечно-сосудистой системы.

Факторы патогенности

ЛТ может нарушать функцию периферических сосудов и проявлять эффекты прямого угнетения миокарда. ОТ может оказывать даже более выраженные воздействия на периферические сосуды, чем ЛТ, включая возможность вмешиваться в действия обычных вазопрессоров. В дополнение к этому, ОТ также проявляет способность влиять на задержку натрия и воды почками. Важным обстоятельством является то, что токсины оказывают свои действия посредством совершенно различных механизмов и поэтому обладают потенциалом усугублять шок и исход инфекции взаимодополняющим образом. Наконец, оба токсина способны угнетать защиту хозяина и очищение от микробов, вероятно, способствуя развитию массивной бактериемии, отмечаемой у пациентов, умирающих от сибирской язвы. Этот последний пункт является клинически значимым, поскольку появляются новые данные о вовлечении других бактериальных компонентов, таких, как клеточная стенка, в развитие шока и повреждение органов, наблюдаемых при инфекции.

Факторы патогенности

3. Система приобретения железа

Функция приобретения железа у патогенных микроорганизмов ассоциируется с проявлением вирулентности.

Железо – необходимый для роста и размножения бактерий микроэлемент. В отличие от высших организмов, которые могут получать биологически доступное железо из пищи, бактерии должны получать железо из окружающей их среды. Это представляет сложную задачу, поскольку растворимое Fe^{3+} в водной содержащей кислород среде обычно существует в аттомолярных (10^{-18}) концентрациях. Гомеостаз железа у млекопитающих хозяев также строго регулируется; практически в сыворотке не существует железа, которое не было бы связано с гемом, железосодержащими белками (ферритин, трансферрин и т.п.) или в виде кофакторов разных ферментов. Известно, что строгий контроль доступности железа у млекопитающих служит барьером против инфекций. Эффективность, с которой железо приобретается патогенными бактериями, соответствует, как правило, их вирулентности.

Факторы патогенности

По существу, взаимодействие между секвестрацией железа организмом хозяина и получением его патогеном является важным определяющим фактором в установлении инфекции. Один из способов получения железа состоит в использовании высокоаффинных хелатирующих агентов ионов железа, называемых сидерофорами.

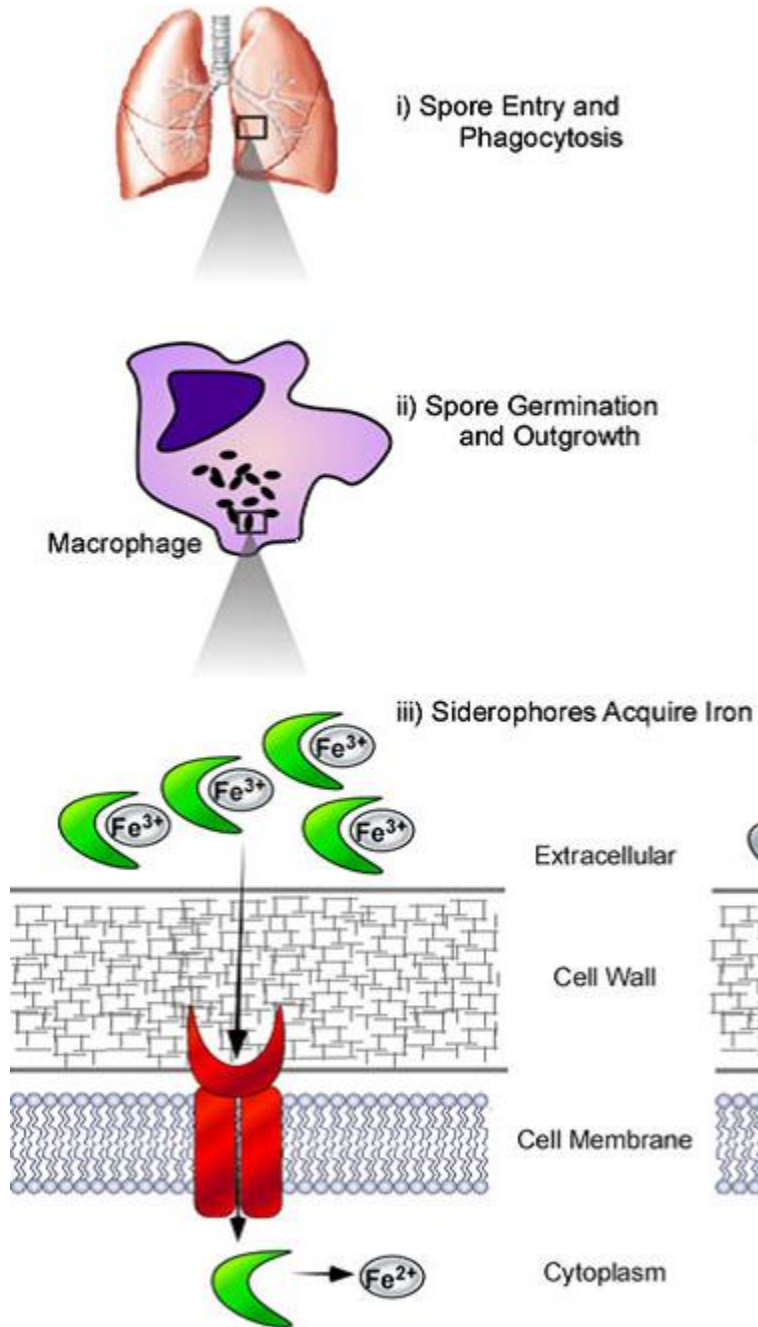
Второй способ определяется тем, что железо у позвоночных хозяев главным образом депонировано в геме, связано с гемоглобином в эритроцитах, и реализуется, благодаря функции белков-гемофоров.

У *B.anthraxis* функционируют оба эти пути.

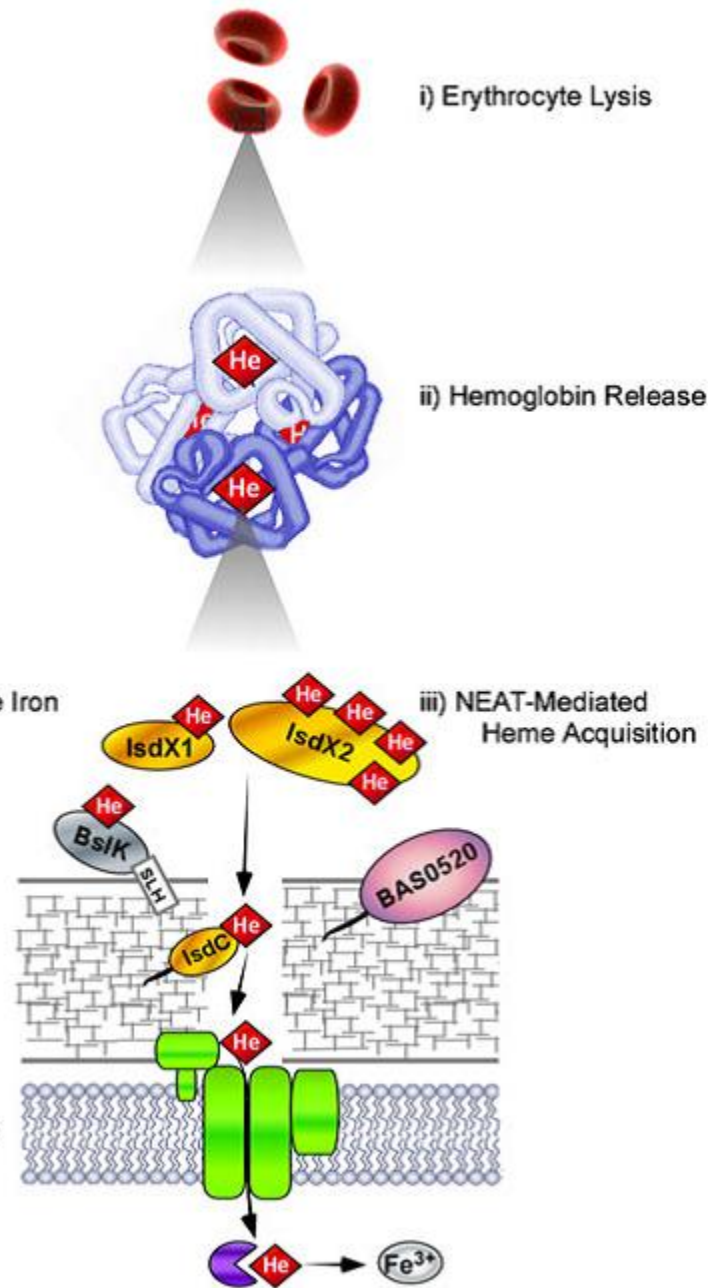
Сидерофоры бациллибактин и петробактин действуют на внутриклеточной стадии инфекции

Гемофоры как правило, секретируются во внеклеточное пространство, где они экстрагируют гем из таких источников, как гемоглобин. Затем связавший гем гемофор доставляет его в таком виде к специфическому рецептору на поверхности бактерии, что приводит к импорту гема в бактериальную клетку.

(a) Intracellular Iron Acquisition



(b) Extracellular Heme-Iron Acquisition



Факторы патогенности

4. Протеазы

Предполагают, что они являются многофункциональными факторами патогенности, содействующими патологическому процессу при сибирской язве посредством прямой деградации тканей, увеличения проницаемости барьеров и модуляции защиты хозяина.

Экзопротеазы камелизин и иммунный ингибитор, как считают, вовлечены в реализацию вирулентности *B.anthraxis* и *B.cereus*

5. Гемолизины

Антролизин O способен вызывать гибель полиморфноядерных лейкоцитов, моноцитов, нейтрофилов, макрофагов и лимфоцитов человека и может представлять собой ранее не идентифицированный фактор вирулентности сибиреязвенного микроба.

Нарушение продукции факторов патогенности ведет к ослаблению вирулентности или к авирулентности.

Бактериофагия сибиреязвенного микроба. Виды бактериофагов.

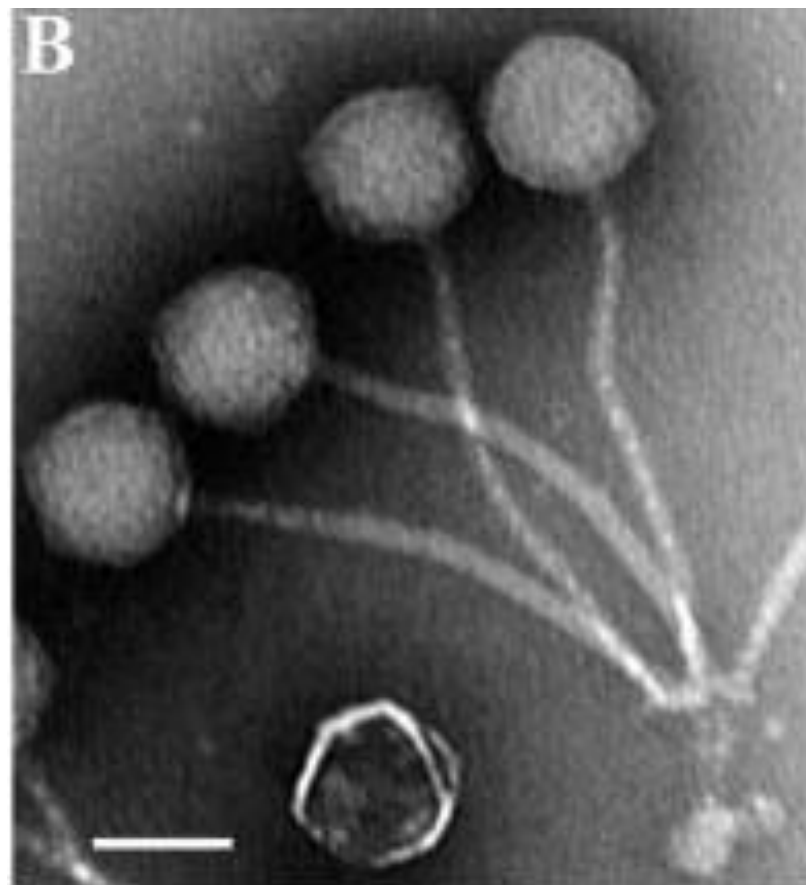
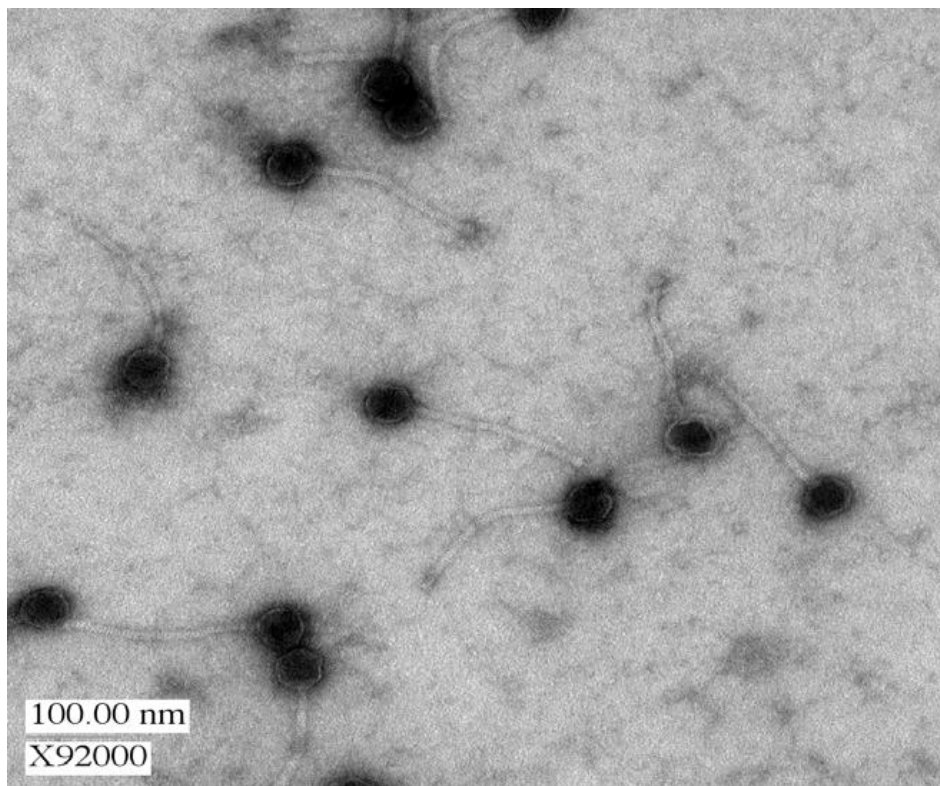
Впервые перевиваемый лизис бактерий (сибиреязвенной палочки) наблюдал в 1898 русский микробиолог Н. Ф. Гамалея. История происхождения фага Гамма довольно запутана. McCloy выделила фаг $W\beta$ из штамма *B. cereus* W (ATCC 11950) и установила, что он довольно специфичен для *B. anthracis*, хотя и инфицирует несколько штаммов *B. cereus*. $W\beta$ образовывал мутные колонии на газоне *B. anthracis* и был неспособен инфицировать свой оригинальный источник, штамм *B. cereus* W, однако его редкий мутант, названный $W\alpha$ и образующий прозрачные колонии, мог инфицировать и *B. anthracis*, и штамм *B. cereus* W. Оба фага, $W\beta$ и $W\alpha$, могли лизировать только штаммы *B. anthracis*, не способные образовывать капсулу, что ограничивало их пригодность в качестве типизирующих фагов.

Бактериофагия сибиреязвенного микроба. Виды бактериофагов.

Фаг Гамма (γ) был выделен Brown и Cherry в 1955 г. как вариант фага W, образовавшийся после повторного инфицирования штамма *B. cereus* W лизатом фага W. Он обладал уникальной способностью инфицировать как гладкие (капсульные), так и шероховатые (бескапсульные) штаммы, а также лизогенные по фагу W штаммы *B. anthracis*. Поскольку многие штаммы *B. anthracis* капсульные, W γ стал ценным инструментом для типирования штаммов. Другой фаг *B. anthracis*, названный фагом Cherry, также использовался для типирования, хотя и реже, однако его родство с фагом Гамма оставалось неизвестным. Определение нуклеотидных последовательностей этих фагов позволило установить их общее происхождение. Геномы фагов оказались идентичными, за исключением трех вариабельных локусов, которые были гетерогенными у фагов Cherry, W, Fah, а так же у индивидуальных препаратов фагов (Fouts D. E. et al., 2006).

.

Бактериофагия сибиреязвенного микроба. Виды бактериофагов.



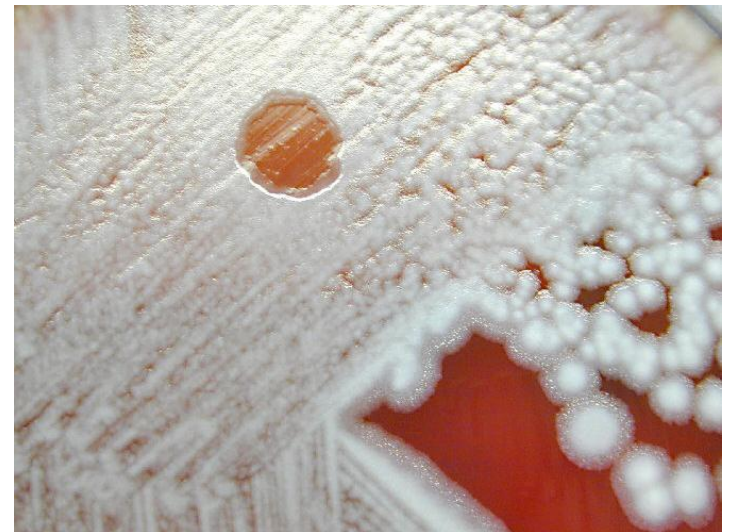
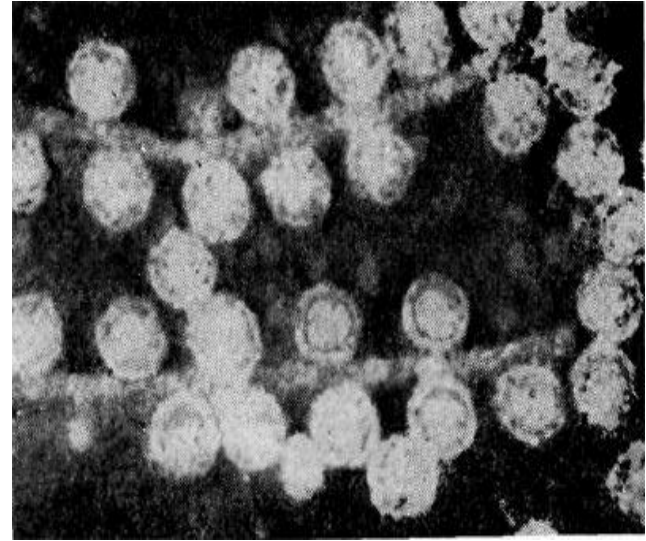
Бактериофагия сибиреязвенного микроба. Виды бактериофагов.

Наибольшее применение для идентификации штаммов *B. anthracis* нашли сибиреязвенные бактериофаги «К ВИЭВ», «Гамма-МВА, «ВА-9» , «Fah», ВА-104, З-БК2, «Саратов», W и др. [Груз Е.В., 1965; Земцова И.Н., 1965; Коротич А.С., Погребняк Л.И., 1976; Преснов И.Н., 1966, 1967; Brown E.R., Cherry W.B., 1955; Brown E.R. et al., 1958].

Предложенный бактериофаг «Fah ВНИИВВиМ», разработанный во Всесоюзном научно-исследовательском институте ветеринарной вирусологии и микробиологии, по данным авторов, лизировал не менее 98 % исследованных сибиреязвенных штаммов и не взаимодействовал с другими видами бацилл [И.А. Бакулов с соавт., 2001].

Бактериофагия сибиреязвенного микроба. Виды бактериофагов.

Выделенный недавно бактериофаг R лизирует 90 % изученных сибиреязвенных штаммов и не проявляет литической активности к штаммам близкородственных бацилл. Бактериальный вирус имеет икосаэдрическую головку диаметром 55 нм и не имеет хвостового отростка).



Чувствительность к антибактериальным препаратам.

Сибиреязвенный микроб высокочувствителен к большинству антибиотиков. Случаи выделения штаммов с устойчивостью к антибиотикам крайне редки. Антибиотикограмма может выглядеть следующим образом:

Чувствительность к антибиотикам (резистентный (R resistance) с промежуточной чувствительностью (MS medium sensitive) чувствительный (S - sensitive):	
ампициллин	35 мм - S
пенициллин	35 мм - S
неомицин	30 мм - S
энрофлоксацин	35 мм - S
тилозин	26 мм - S
левомицетин	26 мм - S
стрептомицин	25 мм - S
канамицин	25 мм - S
тетрациклин	35 мм - S
ципрофлоксацин	24 мм - S
рифампицин	25 мм - S
полимиксин	13 мм - R

Чувствительность к антибактериальным препаратам.

Кроме полимиксина, сибиреязвенный микроб устойчив к действию триметоприма, цефалоспоринов II – III поколения, фосфомицину, умеренно устойчив к эритромицину и азитромицину. Исходя из этого, были предложены селективные питательные среды для возбудителя сибирской язвы, в состав которых входили сочетания полимиксина и триметоприма, цефазолин, фосфомицин. При высеве на эти среды исследуемого на наличие сибиреязвенного микроба материала, загрязненного посторонней микрофлорой, например, проб почвы, мяса, рост этой микрофлоры в значительной степени подавлялся, что способствовало отбору колоний *B.anthraxis*

Чувствительность к антибактериальным препаратам.

Чувствительность сибиреязвенного микроба к пенициллину используется для дифференциации его от близкородственных бацилл, которые устойчивы к этому антибиотику. Это так называемый тест «жемчужного ожерелья». Для его постановки в жидкую питательную среду добавляют 0,5 и 0,05 ЕД / мл пенициллина и осмотический стабилизатор – лошадиную сыворотку. После инкубации в этой среде исследуемой культуры из нее делают мазок и микроскопируют. Клетки сибиреязвенного микроба выглядят как цепочки шарообразных образований – сферопластов, которые формируются в результате частичного лизиса клеточной стенки. Клетки других бацилл сохраняют обычную форму. Чувствительность культуры можно также проверить обычным дискодиффузионным методом.

Чувствительность к антибактериальным препаратам.



Тест «жемчужного ожерелья»

Жизнеспособность и устойчивость (вегетативных форм и спор) в окружающей среде

Возбудитель сибирской язвы в зависимости от биологической формы существования обладает различной устойчивостью к неблагоприятным факторам внешней среды. Микроб в вегетативной форме характеризуется обычной резистентностью, свойственной другим бактериям. Споры возбудителя отличаются исключительной устойчивостью. Они остаются жизнеспособными при воздействии низких температур - замораживание в жидком азоте (-190 °С) не нарушает их жизнедеятельности. Споры выдерживают кипячение в воде до 30 мин, действие текучего пара – до 12 мин, сухого жара при температуре 120 °С – до 2 ч.

Особенности дезинфекции при работе с культурами возбудителя сибирской язвы.

Прямой солнечный свет убивает споры только через 4 – 20 сут. Этиловый спирт в концентрации 40, 70 и 96 % является ненадежным средством дезинфекции материала, содержащего споры. В качестве средств и методов дезинфекции, используемых при работе с возбудителем сибирской язвы, утверждены:

2. Бактерии, образующие споры

2.1. Химический метод обеззараживания с использованием дезинфицирующих средств

2.1.1. Хлорактивные:

- Хлорамин (содержание активного хлора – АХ, не менее 24 %):
1—4 %-е активированные растворы, содержащие АХ 0,25 – 1 %.

Особенности дезинфекции при работе с культурами возбудителя сибирской язвы.

- Хлорная известь или белильная термостойкая известь (содержание АХ не менее 25 %):

 - 20 %-е осветленные и не осветленные растворы, содержащие не менее 5 % АХ;

 - 4 %-е активированные осветленные растворы, содержащие не менее 1 % АХ.

- Кальция гипохлорит нейтральный (КГН) - содержание АХ 45—54 %:

 - 15 %-е осветленные растворы, содержащие не менее 5 % АХ;

 - 2 %-е активированные осветленные растворы, содержащие не менее 1 % АХ;

- Двусосновая соль гипохлорита кальция – ДСГК (содержание АХ не менее 30 %):

 - 4 %-й (по препарату) активированный осветленный раствор, содержащий не менее 1,0 % АХ (в качестве активаторов хлорных препаратов могут быть использованы аммонийные соли (хлорид, сульфит или нитрат аммония) в соотношении с хлорным препаратом 1 : 1 или 1 : 2 или аммиак в соотношении с хлорактивным средством 1 : 8).

- Дезинфицирующие средства на основе натриевой соли дихлоризоциануровой кислоты (таблетки, гранулы).

- Дезинфицирующие средства на основе трихлоризоциануровой кислоты (таблетки, гранулы).

Особенности дезинфекции при работе с культурами возбудителя сибирской язвы.

2.1.2. Кислородактивные:

- Водорода перекись (содержание ПВ не менее 30 %):
3 %-й по ПВ раствор с 0,5 % моющего средства (Прогресс, Новость, Лотос, Астра или эквивалент) при 50 °С;
6 %-й по ПВ раствор с 0,5 % моющего средства (Прогресс, Новость, Лотос, Астра или эквивалент) при 20 и 50 °С;
10 %-й по ПВ раствор;
6 %-й по ПВ раствор с 1 % муравьиной кислоты и 0,1 % ПАВ.
- Средства на основе ПВ и других кислородактивных соединений

2.1.3. Альдегиды:

- Формалин (содержание формальдегида 40 %):
20, 40 %-е по формальдегиду водные растворы.
- Дезинфицирующие средства на основе глутарового альдегида.

2.1.4. Щелочи:

- Едкий натр:
10 %-е по препарату раствор при температуре 70 °С.

Особенности дезинфекции при работе с культурами возбудителя сибирской язвы.

2.2. Физические методы обеззараживания

2.2.1. Кипячение:

- вода;
- 2 %-й раствор пищевой соды;
- 2 %-й раствор кальцинированной соды.

2.2.2. Обработка водяным насыщенным паром под избыточным давлением в паровом стерилизаторе (автоклаве):

- 0,20 МПа (2,0 кгс/см²), (132 ± 2) °С.

2.2.3. Обработка горячим воздухом (180 °С) в воздушном стерилизаторе.

2.2.4. Обработка СВЧ-излучением. СП 1.3.3118-13, страница №108

2.2.5. Обработка в дезинфекционных камерах: паровоздушный, пароформалиновый, паровой методы.

Морфологические, биохимические и физиологические основы идентификации возбудителя сибирской язвы



Экология возбудителя сибирской язвы

Экология возбудителя сибирской язвы определяет эпидемиологические и эпизоотические особенности данной инфекции, относящейся к группе особо опасных болезней общих для человека и животных. Видовые свойства возбудителя, а именно, способность существовать в природе в трех формах - вегетативной, капсульной и споровой - обусловили его возможность длительное время выживать во внешней среде, прежде всего в почве, приспособляясь к неблагоприятным условиям.

Экология возбудителя сибирской язвы

У сибиреязвенного микроба в природе существует две фазы существования - биотическая и абиотическая. Чередование кратковременного пребывания микроба в инфицированном макроорганизме с последующим длительным пребыванием в почве обеспечивает непрерывность эпизоотического процесса, устойчивость существования популяции микроба в природе и сохранение его как биологического вида. Способность к циркуляции *B. anthracis* между двумя экологическими средами (живые организмы и почва) послужили основанием отнести сибирскую язву в группу сапрозоонозов (по классификации FAO/ВОЗ, 1969).

Экология возбудителя сибирской язвы

При инфекционном процессе, размножаясь в огромном количестве в живом организме, микроб не может спорулировать и его популяция после гибели хозяина подвергается отмиранию под действием гнилостной микрофлоры. Однако такая ситуация наблюдается редко. Чаще всего трупы животных растаскиваются хищными птицами и плотоядными животными, и в органах трупа в присутствии кислорода воздуха формируются споры, которые затем попадают в почву. Немаловажным является и то обстоятельство, что сибиреязвенный микроб попадает в почву в течение болезни животного с различными выделениями (слюна, моча, кал).

Экология возбудителя сибирской язвы

- Взгляды на судьбу возбудителя сибирской язвы в почве отличаются разнообразием и противоречивостью. Характер дальнейшего существования возбудителя после попадания спор в почву, служит предметом дискуссий и альтернативных представлений.
- В соответствии с одним из них, сохранение *B. anthracis* в окружающей среде, зависят от споруляции в масштабе, достаточном для выживания популяции, и от последующего размножения в организме животного. Это выражено концепцией «образуй споры или умри».

Экология возбудителя сибирской язвы

- Альтернативой сохранения возбудителя в почве исключительно в виде покоящихся спор является способность прорасти вне организма животного, если позволяют условия. Это соответствует гипотезе «инкубаторных областей», представляющих собой впадины в местах с известковыми содержащими карбонат кальция и щелочными почвами, в которых собирается вода и отмершая растительность, обеспечивающие среду для прорастания и размножения спор сибиреязвенного микроба. Сравнительно недавно установлена возможность эндосимбиоза *B. anthracis* с почвенными амебами *Acanthamoeba castellanii* с размножением внутри простейших.

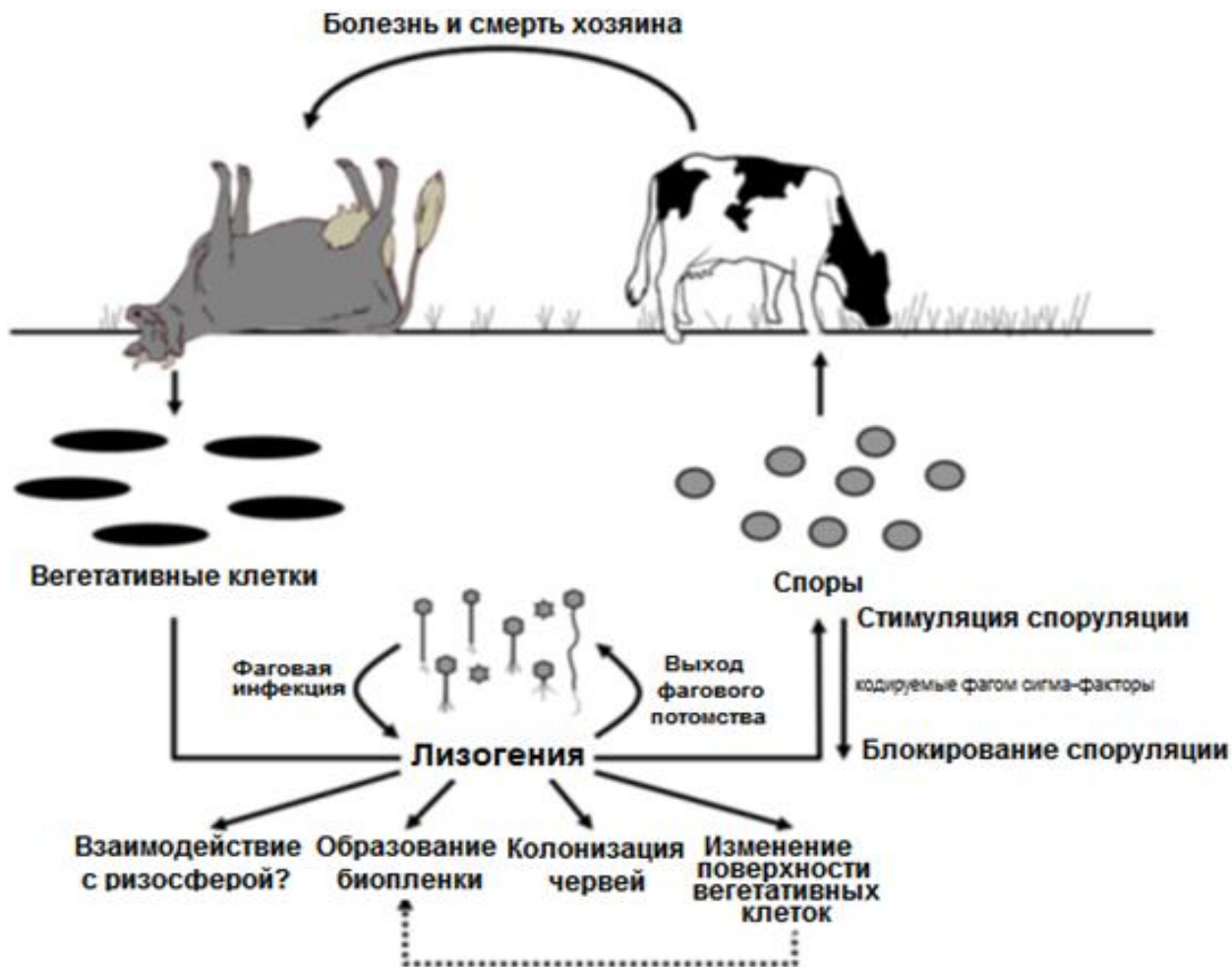
Экология возбудителя сибирской язвы

- Вероятно, достаточный для прорастания и размножения уровень питательных веществ в природных условиях встречается не часто. Если споры прорастают, появившиеся вегетативные клетки будут погибать спонтанно, или в результате конкуренции со стороны почвенной микрофлоры, или под влиянием обоих процессов. Тогда, если дальнейшие обычные циклы воспроизводства не происходят, со временем *B. anthracis* элиминируется.
- Консервативная природа вида *B. anthracis* также противоречит концепции частого возникновения вспомогательного цикла развития во внешней среде. Известно также, что штаммы возбудителя сибирской язвы, выделенные из почвы старых скотомогильников, часто имеют сниженную вирулентность и лишены одной или обеих плазмид.

Экология возбудителя сибирской язвы

- Более динамичный жизненный цикл возникает при взаимодействии *B. anthracis* с бактериофагами, вызывающими фенотипические изменения и появление лизогенных вариантов с резко измененной способностью к выживанию. Лизогения блокирует или напротив, стимулирует споруляцию в зависимости от фага, индуцирует экспрессию экзополисахарида и образование биопленки и делает возможной длительную колонизацию почвы, а также кишечника червей *Eisenia fetida*. Все лизогены *B. anthracis* существуют в виде псевдолизогенов, распространяющих фаги, которые, в свою очередь, инфицируют нелизогенные реципиенты *B. anthracis* и придают им фенотип, позволяющий выживать в этом окружении

Экология возбудителя сибирской язвы



Экология возбудителя сибирской язвы

Анализ концепций жизненного цикла *B. anthracis* дает основания предположить, что этому микроорганизму присуща гибкость стратегии выживания в окружающей среде. К этому выводу подводит также очевидная сложность и многократное дублирование системы, обеспечивающей восприятие сигналов окружающей среды и запускающей ключевой процесс прорастания спор, то есть возможность «прорасти или не прорасти».

Иммунология. Особенности развития иммунитета.

До настоящего времени до конца все механизмы иммунитета при сибирской язве остаются невыясненными. Иммунный ответ характеризуется большой сложностью и многогранностью. Не вызывает сомнения существенная роль в противосибиреязвенном иммунитете гуморальных факторов. Подтверждением тому служит высокая превентивная активность противосибиреязвенной гипериммунной сыворотки и специфического иммуноглобулина, а также сывороток у привитых животных и людей.

Иммунология. Особенности развития иммунитета.

С открытием экзотоксина *B.anthraxis* и установлением его значения в патогенезе и индукции специфического иммунитета сложилось представление о ведущей роли гуморального антитоксического иммунитета в формировании приобретенной резистентности. На ранней стадии заболевания антитоксины нейтрализуют повреждающее действие токсина на фагоциты, а в разгар инфекции предотвращают развитие вторичного инфекционного шока. В то же время показано, что одного гуморального иммунитета недостаточно для полноценной защиты. Это выяснилось после обнаружения так называемых «вакцинорезистентных» штаммов.

Иммунология. Особенности развития иммунитета.

До этого проверку эффективности химической вакцины производства фирмы BioPort Corp (USA), которая представляет собой адсорбированный на гидроксид алюминия культуральный фильтрат бескапсульного непротеолитического штамма V770, проводили заражением вакцинированных животных вирулентным штаммом Vollum, авирулентным производным которого был штамм V770. В этих экспериментах вакцина надежно защищала от заражения штаммом Vollum. Однако, когда для заражения использовали другие вирулентные штаммы, в частности Ames, вакцина оказалась неэффективной.

Иммунология. Особенности развития иммунитета.

Одновременно выяснилось, что живые вакцины типа СТИ или 34F2 Sterne обеспечивают полную защиту от заражения любыми штаммами, а титры сывороточных антител к протективному антигену и летальному фактору не всегда коррелируют с напряженностью иммунитета и наличие их не гарантируют устойчивости у заражению вирулентными штаммами. При трехкратной иммунизации морских свинок факторами токсина или живыми спорами штамма 34F₂ Sterne возникал сходный уровень антител к протективному антигену и летальному фактору, но приобретенная устойчивость оказалась значительно выше у животных, привитых живой вакциной. Поэтому значительную роль отводят клеточно-опосредованному иммунитету.

Иммунология. Особенности развития иммунитета.

Установлено, что живые вакцины формировали как клеточный, так и гуморальный иммунитет, тогда как химические – только гуморальный. По сравнению с химическими вакцинами живые споровые вакцины индуцировали более низкие титры антител к протективному антигену и летальному фактору, но обеспечивали более эффективную защиту. Вероятно, более высокая эффективность живых вакцин по сравнению с химическими является результатом вовлечения в иммуногенез антигенов, отличных от компонентов токсина.

Следует подчеркнуть невозможность разделения специфического иммунитета на клеточный и гуморальный, так как во всех случаях функционирует вся система, но с разной активностью отдельных компонентов.

Иммунология. Неспецифические факторы защиты .

Проведенные исследования свидетельствуют о важной роли в сибиреязвенной инфекции некоторых гуморальных факторов естественной защиты, в том числе бета-лизинов и лизоцима. Установлено, что сибиреязвенная инфекция у кроликов, обезьян и свиней вызывала существенные сдвиги в уровнях исследуемых факторов естественного иммунитета. В инкубационный период и на стадии развития заболевания происходило нарастание количества лейкоцитов крови, возрастало содержание лизоцима и бета-лизинов. Угнетение лизоцимной и бета-лизиновой активностей сывороток крови имеет плохой прогностический признак. При заболевании сибирской язвой оно предупреждает за сутки о возможном смертельном исходе.

Аллергизация. Антраксин. Кожно-аллергическая проба.

Состояние сенсibilизации у переболевших сибирской язвой впервые установили Zironi, Hruska, Belteanu и др., а А.Петров и Е. Кисилев описали метод аллергодиагностики сибирской язвы у животных с помощью предложенного ими препарата антраксина. Э.Н. Шляхов изучил феномен кожной аллергии при сибирской язве и довел до практического использования разработанный им стандартный препарат – химический антраксин. Антраксин представляет собой белково-полисахаридно-нуклеиновый комплекс бескапсульного штамма сибиреязвенного микроба. Как и при других аллергических реакциях, при положительной антраксиновой пробе имеет место пролиферация гистиоцитарных и лимфоидных элементов.

Аллергизация. Антраксин. Кожно-аллергическая проба.

Морфологической особенностью является отек подкожной клетчатки.

Кожно-аллергическую пробу с антраксином ставят в соответствии с Наставлением и реакцию учитывают через 24 и 48 часов по наличию гиперемии и инфильтрата кожи по оценочной шкале.

Гистологическое и иммунологическое изучение кожной реакции определяет ее как реакцию гиперчувствительности замедленного типа, которая отражает наличие клеточного иммунитета к сибирской язве.

Многолетнее применение антраксина показало высокую диагностическую ценность кожно-аллергической пробы. Но есть и ограничения, поскольку она бывает положительной в первые три дня только у 60-80% больных.

Аллергизация. Антраксин. Кожно-аллергическая проба.

Кроме того, она показала положительный результат не только у больных и переболевших, но и у вакцинированных против сибирской язвы даже спустя 11 – 17 месяцев после прививки.

В качестве аллергена предлагалось использовать главный оболочечный белок с массой 92 кДа, который имел преимущества перед антраксином по специфичности, четкости результатов и позволял выявлять в два раза больше положительно реагирующих животных.

Ограничения применения кожно-аллергической пробы и вероятность получения некорректных результатов могут быть связаны как с наличием аллергических заболеваний, так и с анергией вследствие иммунодефицита.

Значимость серологических реакций и аллергической пробы для диагностики сибирской язвы у человека и для исследования продуктов животноводства.

Кожно-аллергическая проба с антраксином у нас до последнего времени была единственным средством лабораторного подтверждения диагноза в отсутствие выделенной от больного культуры. Значимость серологических методов диагностики сибирской язвы у человека относительно невелика из-за отсутствия у нас надежных коммерческих тест-систем. По-прежнему находит применение в ветеринарной практике реакция кольцепреципитации по Асколи для выявления термостабильного в сырье животного происхождения. Однако в последнее время наметился определенный прогресс в связи с введением в практику за рубежом иммуногистохимического исследования для обнаружения в патологическом материале от больного клеточных антигенов сибиреязвенного микроба, разработкой иммуноферментных и иммунохроматографических тест-систем для обнаружения протективного антигена и антител к нему как за рубежом, так и в РФ.

Значимость серологических реакций и аллергической пробы для диагностики сибирской язвы у человека и для исследования продуктов животноводства.

В нашем институте разработан метод аллерготеста *in vitro* с антраксином, в котором исследуется кровь пациента и отпадает необходимость введения аллергена внутрикожно. Сейчас назрела необходимость пересмотра критериев лабораторного подтверждения диагноза сибирской язвы у людей. Как показывает наш опыт, ПЦР с пробами материала от больных оказывается положительной и в том случае, когда культуру выделить не удастся. Учитывая, что частота выделения культуры от больных с явной клиникой сибирской язвы не превышает в лучшем случае 30%, положительная ПЦР может служить надежным и зачастую единственным критерием лабораторного подтверждения диагноза.

Значимость серологических реакций и аллергической пробы для диагностики сибирской язвы у человека и для исследования продуктов животноводства.

В нашем институте разработан метод аллерготеста *in vitro* с антраксином, в котором исследуется кровь пациента и отпадает необходимость введения аллергена внутрикожно. Сейчас назрела необходимость пересмотра критериев лабораторного подтверждения диагноза сибирской язвы у людей. Как показывает наш опыт, ПЦР с пробами материала от больных оказывается положительной и в том случае, когда культуру выделить не удастся. Учитывая, что частота выделения культуры от больных с явной клиникой сибирской язвы не превышает в лучшем случае 30%, положительная ПЦР может служить надежным и зачастую единственным критерием лабораторного подтверждения диагноза.

Характеристика современных типов вакцин

В настоящее время в мировой практике для людей используется несколько вакцин против сибирской язвы разных типов.

1. Живые споровые вакцины – отечественная вакцина СТИ на основе лиофилизированного штамма СТИ-1 и китайская жидкая вакцина на основе штамма А16R. Оба вакцинных штамма – бескапсульные аттенуированные штаммы, приготовленные по технологии, известной с 30-х годов XX века.
2. Химические вакцины – разработанные в 50-х годах XX века в Великобритании и США по единой технологии и представляющие собой адсорбированные на адъюванте из окислов алюминия культуральные фильтраты бескапсульных штаммов 34F₂ Sterne и V770

Характеристика современных типов вакцин

В СтавНИПЧИ Н.П. Буравцовой были разработаны две живые вакцины – на основе штаммов 228/8 и СТИ, причем последний, названный СТИ ПР, имел устойчивость к пенициллину и рифампицину, что позволяло проводить вакцинопрофилактику одновременно с экстренной профилактикой этими антибиотиками.

Недостатком химических вакцин является необходимость вводить их 3 – 6 раз в течение года, кроме того, они вызывают выраженные местные реакции и не защищают от всех штаммов.

Сейчас считают, что и существующие живые вакцины, и химические вакцины недостаточно эффективны.

Характеристика современных типов вакцин

Кроме перечисленных живых и химических вакцин, как перспективные рассматриваются:

комбинированные вакцины, например, вакцина на основе штамма СТИ с протективным антигеном;

рекомбинантные вакцины, например, на основе штамма *Bacillus subtilis* с встроенным геном протективного антигена сибиреязвенного микроба, или на основе штамма сибиреязвенного микроба, лишённого генов отечного и летального факторов и продуцирующего только протективный антиген;

ДНК-вакцины – когда для иммунизации используют экспрессирующие эукариотические плазмиды со встроенным геном протективного антигена

Оральные вакцины - эффективно экспрессирующие антигены сибиреязвенного микроба генноинженерные конструкции на основе, например, лактобацилл, или даже растений.

Характеристика современных типов вакцин

Некоторые исследователи полагают, что идеальная вакцина против сибирской язвы должна :

- Быть живой, поскольку она вызывает напряженный и длительный иммунитет;
- Обладать способностью синтезировать все три компонента сибиреязвенного токсина, стойко утратить способность к образованию капсулы в макроорганизме и индуцировать выработку антител, блокирующих в иммунном организме образование капсулы *B.anthraxis*;
- Вызывать ответную реакцию со стороны клеточных факторов иммунитета;
- Обеспечивать выработку полноценного иммунитета при одновременном использовании средств экстренной профилактики и лечения.

Характеристика современных типов вакцин

Некоторые исследователи полагают, что идеальная вакцина против сибирской язвы должна :

- Быть живой, поскольку она вызывает напряженный и длительный иммунитет;
- Обладать способностью синтезировать все три компонента сибиреязвенного токсина, стойко утратить способность к образованию капсулы в макроорганизме и индуцировать выработку антител, блокирующих в иммунном организме образование капсулы *B.anthraxis*;
- Вызывать ответную реакцию со стороны клеточных факторов иммунитета;
- Обеспечивать выработку полноценного иммунитета при одновременном использовании средств экстренной профилактики и лечения.

Возможность использования возбудителя как одного из вероятных патологических агентов для создания бактериологического оружия.

На протяжении столетий сибирская язва во всем мире была болезнью травоядных животных, от которых она часто передавалась людям и нередко приводила к фатальному исходу. Исследования ее возбудителя как средства биологического оружия начались около 80 лет тому назад, к настоящему времени 17 стран имеют программы создания биологических наступательных вооружений, и неизвестно, сколько из них работают с возбудителем этой инфекции.

Первые успешные масштабные эксперименты по использованию спор сибиреязвенного микроба в качестве боевого агента были проведены на острове Гриньярд (Великобритания) в 1942 и 1943 гг. Около 4×10^{14} спор (четыре сотни триллионов) было распылено при взрыве 3 и 40-фунтовых бомб. Овцы были размещены в рядах по ветру от места взрыва и после воздействия на них образовавшимся облаком аэрозоля животные, вдохнувшие достаточную дозу спор, погибли от сибирской язвы в течение нескольких дней. В течение нескольких десятилетий остров оставался закрытой зоной, в почве которого обнаруживались споры возбудителя в высоких концентрациях. Деконтаминация территории в 1987 году потребовала значительных усилий и затрат.

- Исследования возбудителя сибирской язвы как средства биологического оружия начались около 80 лет тому назад
- К настоящему времени 17 стран имеют программы создания биологических наступательных вооружений, и неизвестно, сколько из них работают с возбудителем этой инфекции
- Остров Гриньярд (Великобритания) 40-е годы 20 века
- Свердловск (1979)
- Террористическая группа, Аум Синрике по меньшей мере восемь раз пыталась распылить споры ВА в Токио в 1995 году, но по непонятным причинам атака не удалась.

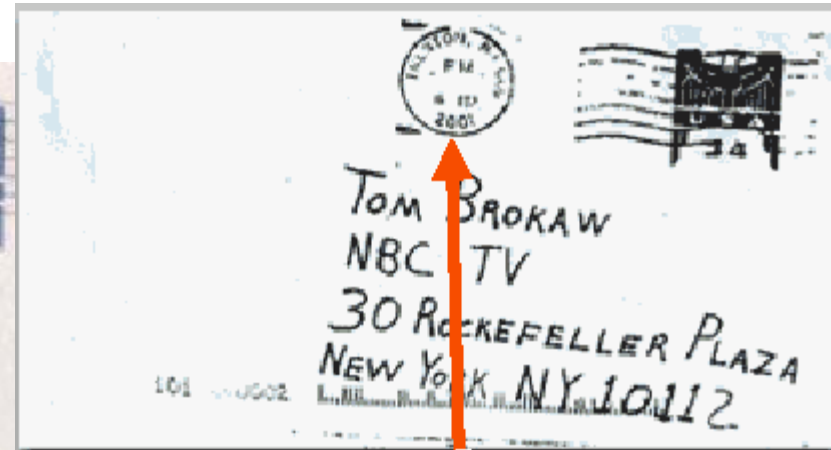
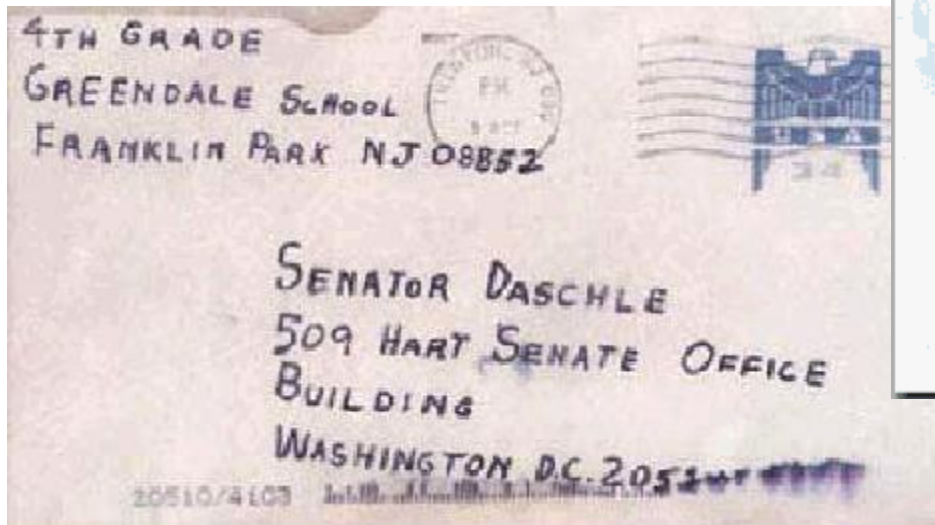


Возможность использования возбудителя как одного из вероятных патологических агентов для создания бактериологического оружия.

- В 1970 году Комитет экспертов ВОЗ дал оценку потерь вследствие распыления с самолета в виде аэрозоля 50 кг спор возбудителя в воздушном пространстве региона с городским населением в 5 млн. человек. Эти потери могли бы составить 250 тыс. человек, из которых 100 тыс. умерло бы без лечения.
- В 1993 году в докладе Офиса оценки технологий Конгресса США прозвучала другая цифра – от 130 тыс. до 3 млн. смертных случаев в результате распространения по ветру в районе Вашингтона 100 кг спор – смертность, сопоставимая с той, к которой приводит взрыв водородной бомбы или превышающая ее. Экономические потери составили бы по расчетам CDC 26,3 млрд. долларов на 100.000 подвергшихся воздействию.

Возможность использования возбудителя как одного из вероятных патологических агентов для создания бактериологического оружия.

- 1979 г. Свердловск – 67 летальных случаев из-за утечки спор на предприятии по их производству
- 2001 г. США – 22 больных, 11 кожная форма, 11 – легочная, 5 летальных случаев из-за рассылки трех конвертов со спорами



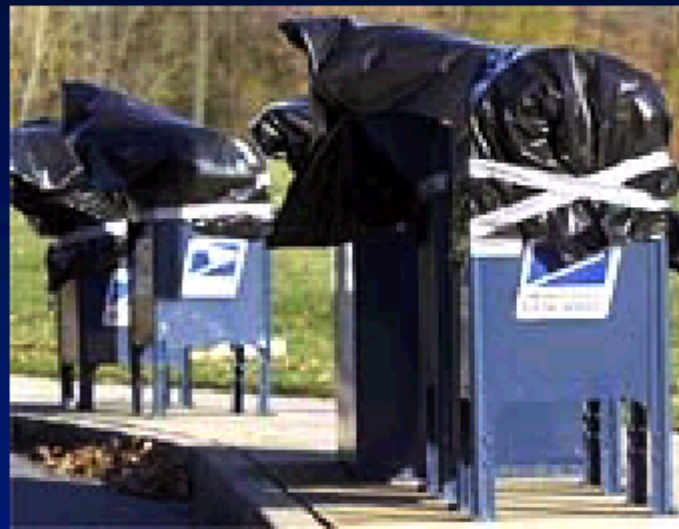
Возможность использования возбудителя как одного из вероятных патологических агентов для создания бактериологического оружия.

Anthrax Then and Now



Woolsorters Disease

«БОЛЕЗНЬ СОРТИРОВЩИКОВ
ШЕРСТИ»



Mailsorters Disease

«БОЛЕЗНЬ СОРТИРОВЩИКОВ
ПОЧТЫ»