

Микробиология и лабораторная диагностика возбудителя чумы





«... Царица грозная, Чума
Теперь идет на нас сама
И льстится жатвою богатой;
И к нам в окошко день и ночь
Стучит могильною лопатой.
Что делать нам? И чем помочь?...»

А.С. Пушкин «Пир во время чумы»

«Чума лишала города их жителей, превращала страну в безлюдную пустыню и приводила к тому, что жилища человека становились прибежищем диких зверей»



Уорнфорд, 542-599 гг. н.э.

Три пандемии чумы, вызванные *Yersinia pestis*, во время которых погибло более 200 млн. человек.

1 - я пандемия

531-580 гг. н.э.

ДРЕВНИЙ БИОВАР

«Чума Юстиниана»

Египет,
Африка,
Западная Азия,
Италия,
Византия

2 - я пандемия

начало 1330-47 гг.

**СРЕДНЕВЕКОВЫЙ
БИОВАР**

«Черная смерть»

Центральная Азия
Европейские страны

3 - я пандемия

начало 1855 г.

ВОСТОЧНЫЙ БИОВАР

Китай (Гонконг),
Индия,
Россия,
Африка,
Азия,
Америка

Заступник
зачумленных -
святой Рох.

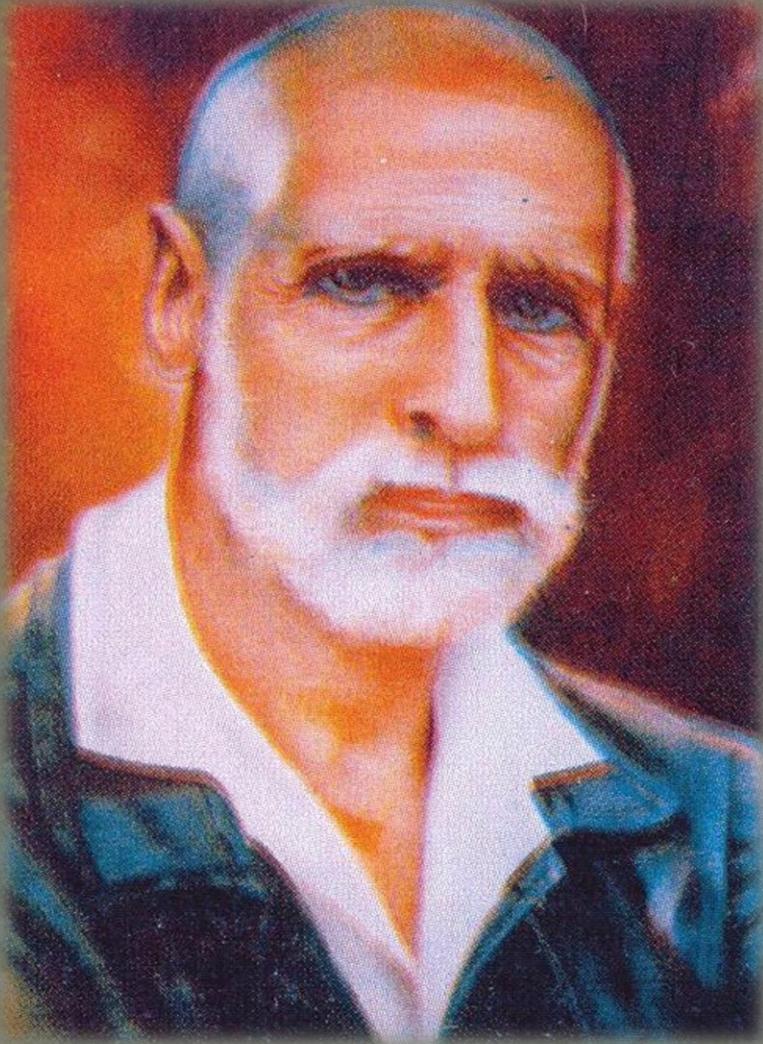




Поммандер — шкатулочка для ароматических трав и веществ, которые должны были «отпугнуть» чуму.



Во время третьей пандемии в Пастеровском институте для вскрытия чумных трупов были разработаны специальные инструменты, необычайная длина которых должна была предотвратить контакт рук патанатома с зараженным материалом. А для переноски тел использовались специальные клещи. Халаты и маски защищали от воздушной инфекции, но не от вездесущих блох.



Александр Йерсен
(Alexander Yersin)
1863-1943 гг.

1894 г.

Гонконг -

открытие

возбудителя

чумы - *Yersinia pestis*

Сибасабуро Китозато (1856 - 1931)



1894 г.

Гонконг

Открытие

возбудителя чумы –

Yersinia pestis



Чума - происхождение термина

- Plague (английское)
- Pest, peste (романские языки)
- Teun (арабское)
- Ciuta (румынское)
- Мор, моровая язва (до XVII в.)
- Чума – Д.Самойлович, 1798 г.

Чума – зоонозная природно-очаговая
особо опасная карантинная
бактериальная инфекционная
болезнь с трансмиссивным
механизмом передачи возбудителя

Б.Л.Черкасский, 1994

«...ЗООНОЗНАЯ...»



Носители чумы:

- Основные
- Второстепенные
- Случайные

Всего около 250 видов животных: в т.ч. грызуны, обезьяны, домашние животные (верблюды, кошки), человек

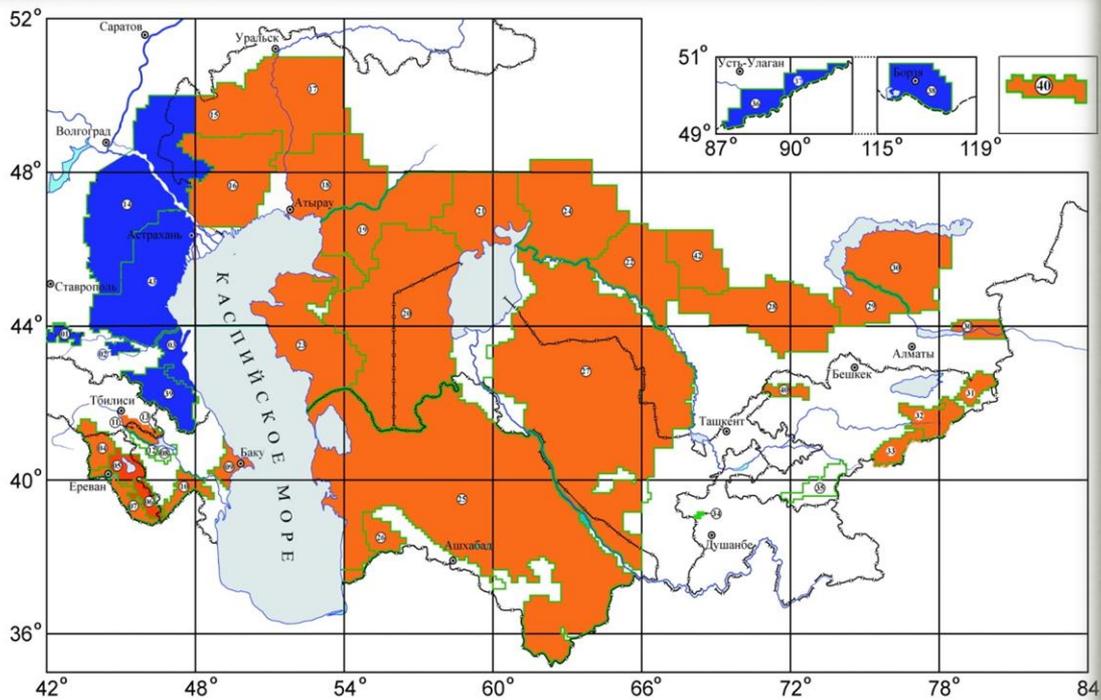




«...природно-очаговая...»

- **Природные очаги** – Азия, Африка, Северная и Южная Америка, часть Европы (исключение - Австралия)
- **СНГ** – Республика Казахстан, Туркменистан, Республика Узбекистан, Республика Таджикистан, Кыргызская Республика, Азербайджанская Республика, Республика Армения, Грузия – 31 природный очаг
- **Россия** - 11 природных очагов чумы площадью 253590 кв.км

Природные очаги чумы России и стран СНГ



Условные обозначения:

- - природные очаги чумы России
- - природные очаги чумы стран СНГ

Всего природных очагов чумы: в России – **11**, в странах СНГ – **31**. Общая площадь очагов 1 898 900 кв.км. Из них в России – 253590 кв.км

В 2008 году эпизоотии чумы зарегистрированы в **5** природных очагах России. Площадь эпизоотии - **1257,11** кв. км. Выделен **161** штамм чумного микроба.

В странах СНГ (Казахстан, Армения)- эпизоотии зарегистрированы в **15** природных очагах чумы. Площадь эпизоотии - **26887** кв.км. Выделено **147** штаммов чумного микроба



«...особо опасная...»

- Особо опасные инфекции – инфекционные болезни, вызываемые возбудителями I-II групп патогенности

I группа патогенности - **Россия**

II-III уровни биологической опасности - **ВОЗ**





«...карантинная...»

(старые ММСП, 1969 г.)

- Чума
- Холера
- Желтая лихорадка



Перечень опасных инфекций

(новые Международные медико-санитарные правила-ММСП, 2005, вступили в силу 15 июня 2007 г.)

Список А

ЧС безусловно международного значения, требующие уведомления ВОЗ

- Оспа
- Полиомиелит, вызванный диким полиовирусом
- Человеческий грипп, вызванный новым подтипом
- Тяжелый острый респираторный синдром (ТОРС)

Список Б

ЧС международного значения в случаях явной угрозы международного распространения

- Холера
- Легочная чума
- Желтая лихорадка
- Вирусная геморрагическая лихорадка (Эбола, Ласса, Марбург)
- Лихорадка Западного Нила
- Другие болезни, например, лихорадка денге, лихорадка долины Рифт и менингококковая болезнь

«...инфекционная болезнь...»

Международная классификация болезней X пересмотра (МКБ10)



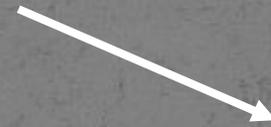
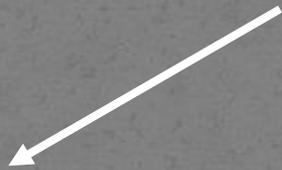
A20	чума
A20.0	бубонная чума
A20.1	целлюлярнокожная чума
A20.2	легочная чума
A20.3	чумной менингит
A20.7	септическая чума
A20.8	другие формы
A20.9	чума неуточненная

Клинические формы чумы (по степени эпидемической опасности- Руднев Г.П.,1960 г)

1. Преимущественно локальные с относительно малой внешней диссеминацией (кожная, бубонная, кожно-бубонная)
2. Внутренне-диссеминированные или генерализованные (первично-септическая, вторично-септическая)
3. Внешне диссеминированные (первично легочная, вторично легочная, кишечная)

**«...с трансмиссивным механизмом
передачи возбудителя»**

грызун → блоха → грызун





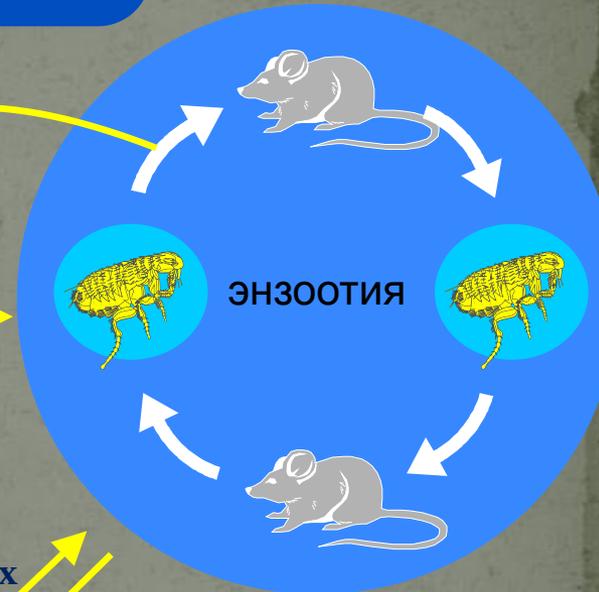
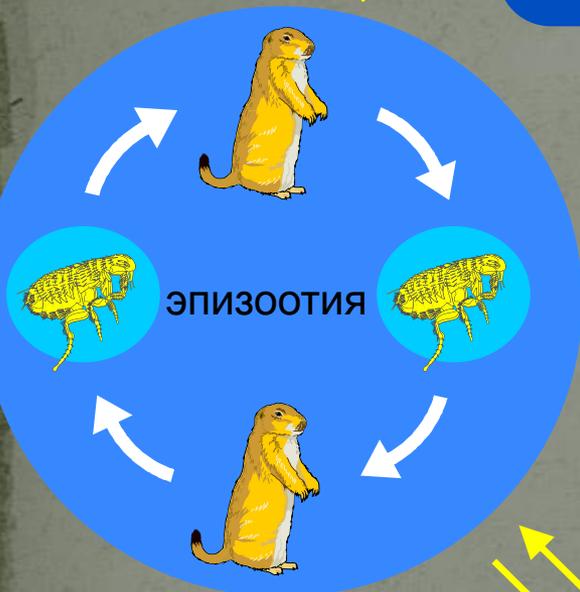
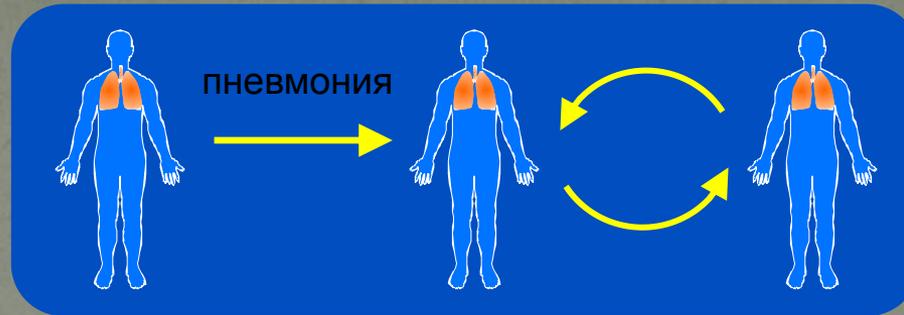
Мамочки!..

Какого же размера
у него блохи?!

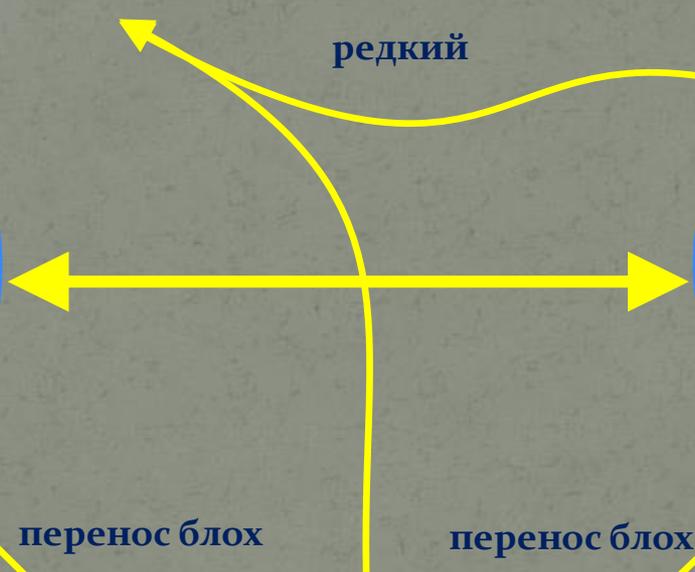


ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ

первичный путь передачи



редкий



укус блохи

перенос блох

перенос блох

укус блохи



Основные внутривидовые классификации

глицерин	нитриты	Наименование разновидности	
		По R.Devingat (1951)	По В.М.Туманскому (1958)
+	+	древняя <i>anthiqua</i>	сурчиная
+	-	средневековая <i>mediavalis</i>	сусликовая
-	+	восточная <i>orientalis</i>	крысиная

Классификация М.И. Леви с соавт. (1961) – на основе чувствительности грызунов к возбудителю чумы и по характеру инфекционного процесса выделили 5 разновидностей* :

- крысиную
- сурчиную
- сусликовую
- песчаночью
- полевочью

* Для использования в практике эпизоотологического мониторинга

Механизм заражения

1. Трансмиссивный (укус блох)
2. Контактный (при снятии шкурок и разделке туш больных животных)
3. Аспирационный с воздушно-капельным и воздушно-пылевым путем передачи (при снятии шкурок, рубке мяса, при контакте с больным первичной или вторичной легочной формами чумы)
4. Фекально-оральный (при употреблении в пищу инфицированного мяса)

Периоды в развитии микробиологии возбудителя чумы

- **1894-1928 гг.** - открытие возбудителя и изучение свойств *Yersinia pestis*, открытие природной очаговости чумы
- **1928-1947 гг.** – создание средств и методов диагностики и специфической профилактики (микробиологические исследования)
- **1947-1980 гг.** – открытие видоспецифичных антигенов и факторов патогенности (генетические и биохимические исследования)
- **1980-по настоящее время** – открытие внехромосомных репликонов (плазмид), полный сиквенс генома (молекулярная микробиология)



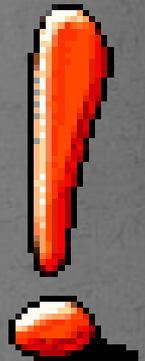
Таксономия *Yersinia pestis*

- Домен «Bacteria»
- Тип В XII. Proteobacteria
- Класс III. Gammaproteobacteria
- Порядок XIII. Enterobacteriales
- Семейство I. Enterobacteriaceae
(включает 17 родов, имеющих значение для
медицины)
- Род XL. *Yersinia*

Род XL. *Yersinia*

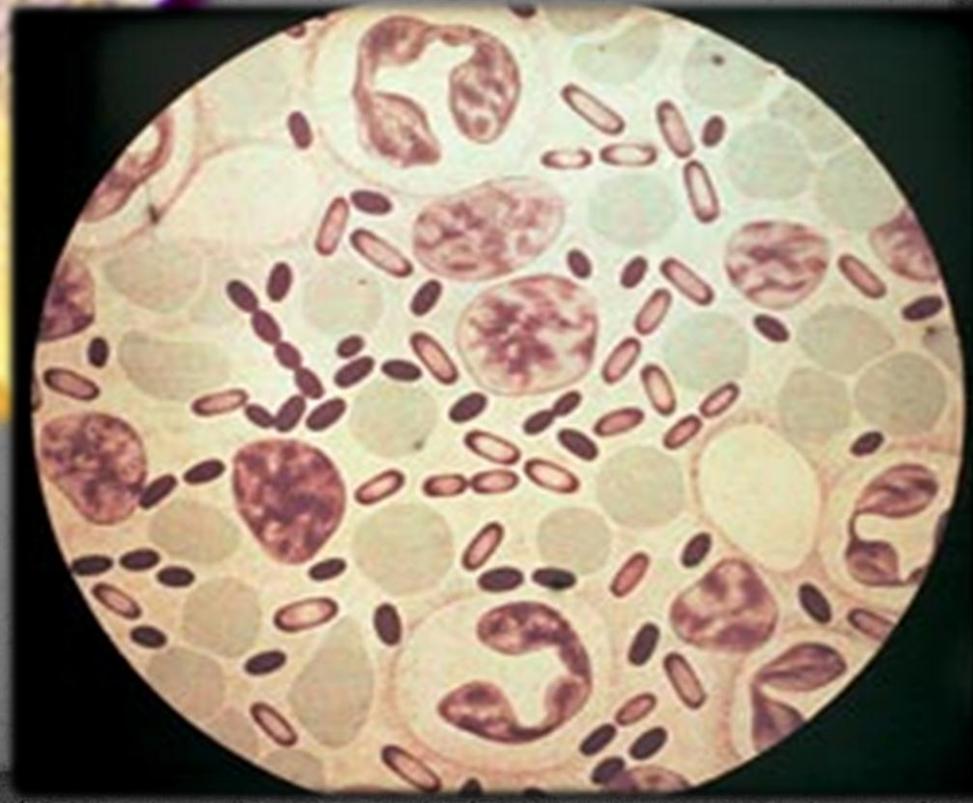
Включает 11 видов бактерий, из которых три имеют важнейшее значение для медицинской микробиологии:

- *Yersinia pestis** – возбудитель чумы
- *Yersinia pseudotuberculosis** – возбудитель псевдотуберкулеза грызунов
- *Yersinia enterocolitica* – возбудитель кишечного иерсиниоза

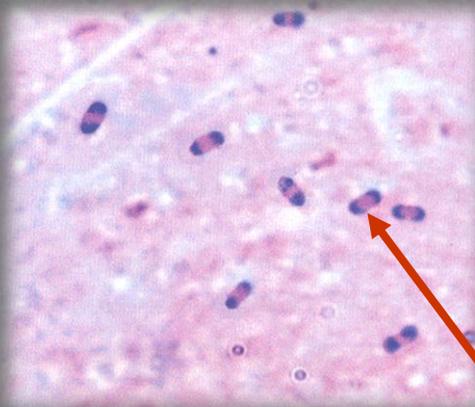


* *Y.pestis* и *Y.pseudotuberculosis* имеют около 90% гомологии ДНК (Н. Vercovier et al., 1980)

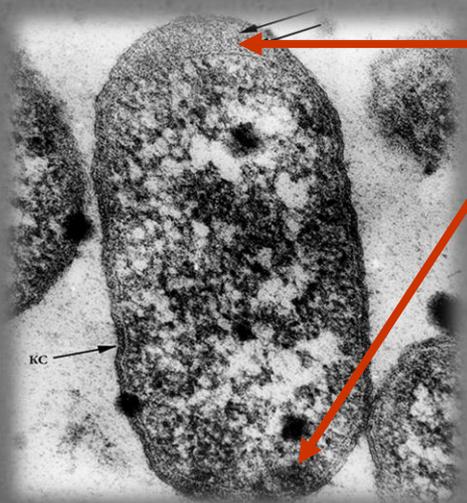
Возбудитель чумы – *Yersinia pestis*



Морфология и тинкториальные свойства



- Грамотрицательная
- палочка овоидной формы (0,5-0,8x1-3 мкм)
- биполярная
- неподвижная
- спор не образует
- капсула при 37°C





Культуральные свойства

- Психрофил – 28°C (2-40°C)
- Тип дыхания – факультативный анаэроб
- Тип питания – хемогетеротроф

Природный ауксотроф:

основные - met phe thr cys

дополнительные – arg leu thi (по очагам)



Ферментативная активность

- Ферментирует: глюкозу, галактозу и т.д.
- Не ферментирует: лактозу, сахарозу
- Глицерин: «+/-»
- Рамноза: «-/+»
- Уреаза отсутствует
- Желатину не разжижает
- Белки не гидролизует

Эколого-географические формы чумного микроба

1 форма - штаммы чумного микроба, не ферментирующие глицерин и образующие нитриты. Это – эколого–географическая форма чумного микроба была названа **крысиной** Туманским и **восточной** Девинья.

2 форма - штаммы чумного микроба, ферментирующие глицерин, образующие нитриты. Это – **сурчинная** чума по Туманскому и **древняя** по Девинья.

3 форма - штаммы, ферментирующие глицерин, но не образующие нитриты. Это – **сусликовая** чума по Туманскому и **средневековая** по Девинья.

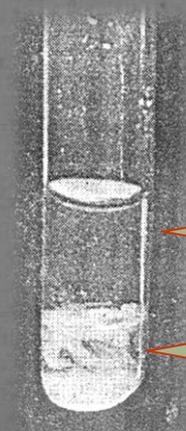
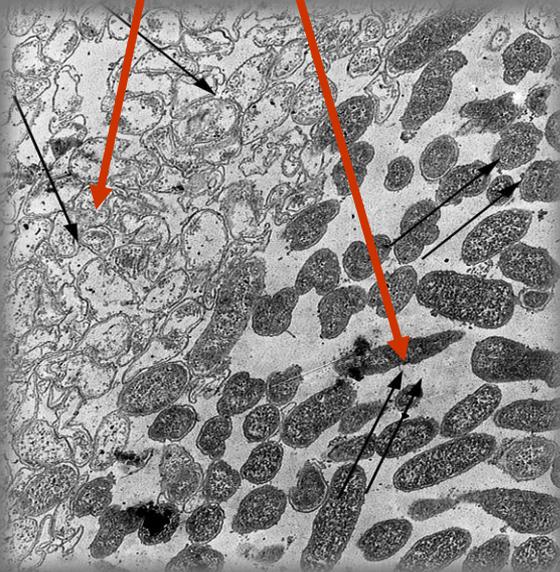
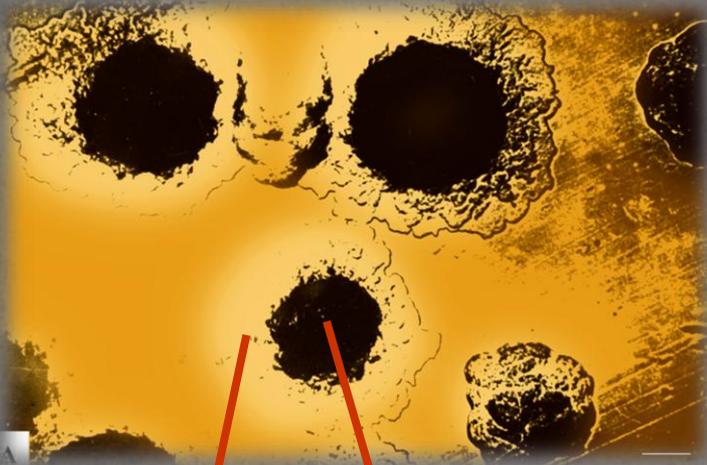
Условия культивирования и требования к питательным средам



- Питательные среды должны содержать продукты глубокого гидролиза белков – аминокислоты, пептиды
- Стимуляторы роста:
 - 1-5% гемолизированная кровь
 - 0,025% р-р сульфита Na
- Оптимальная t культивирования – 26-28°C
- рН среды – 7,0-7,2
- Ингибиторы роста посторонней микрофлоры:
 - генцианвиолет (1:100-1:800 тыс.),
 - фосфомицин (50 мкг/мл)



Рост на питательных средах



- **Р форма**
- **Фазы роста на плотных ПС:**

а) латентная – 3-8 ч «нити»

б) логарифмическая –
16-24 ч «битое стекло»
24-36 ч «кружевные
платочки»

в) стационарная – до 48 ч
макроколонии

- **Жидкие ПС:**

← прозрачный бульон

← пристеночный рост

Возбудитель чумы патогенен для человека, грызунов, зайцеобразных, хищников, парнокопытных, верблюдов, приматов и птиц. Восприимчивые лабораторные животные: мыши, морские свинки, белые крысы, кролики.

Высоковирулентные штаммы – ЛД₅₀ равна менее 5-10 м.к. при подкожном заражении белых мышей.

Слабовирулентные – ЛД₅₀ более 1×10^5 м.к.

Авирулентные – ЛД₅₀ более 1×10^6 м.к.



Геном возбудителя чумы



Хромосома – 4.65 м.п.н.
Плазмиды: pFra
pCad
pPst

pCad - родоспецифична



Кодирует синтез
V-антигена и
эффекторных белков Yop

pFra

pPst

видоспецифичны



ФI
Tox (мышиный токсин)

Пестицин
Активатор плазминогена

ХРОМОСОМА

Область пигментации (Pgm область)



Hms локус -
кодирует белки
аккумуляции
гемина



Его утрата –
потеря
способности
заражать блоху

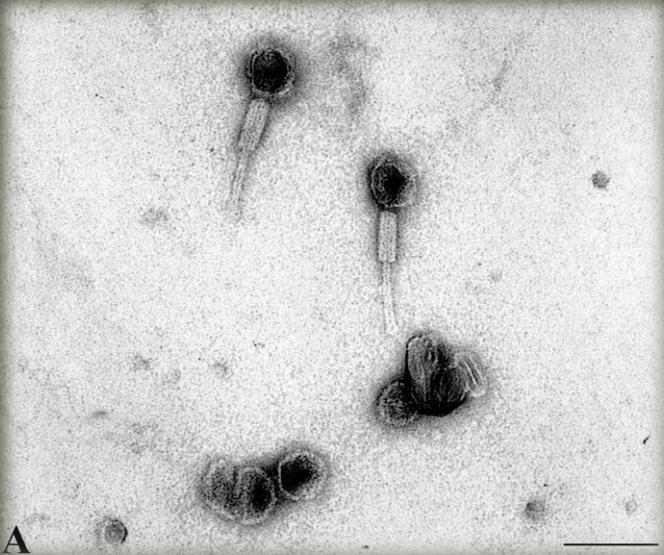


Остров высокой
патогенности НРІ



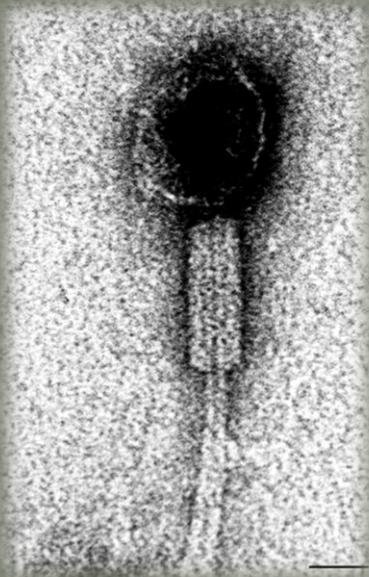
Его утрата – потеря
вирулентности
Y.pestis для животных
и человека

Бактериофагия у *Yersinia pestis*

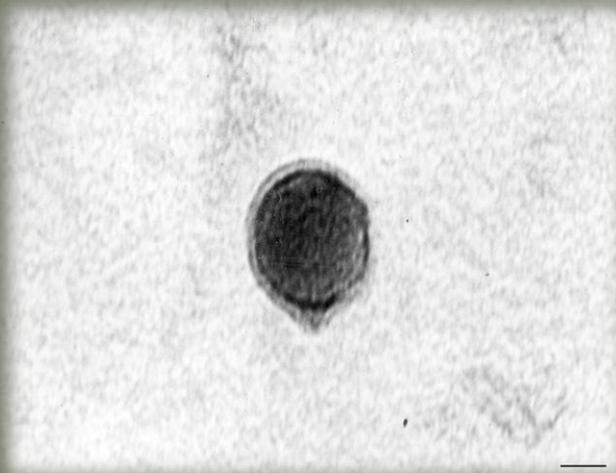


Практически каждый известный в настоящее время вид бактерий является хозяином для одного или нескольких вирусов (бактериофагов)

Диагностические бактериофаги

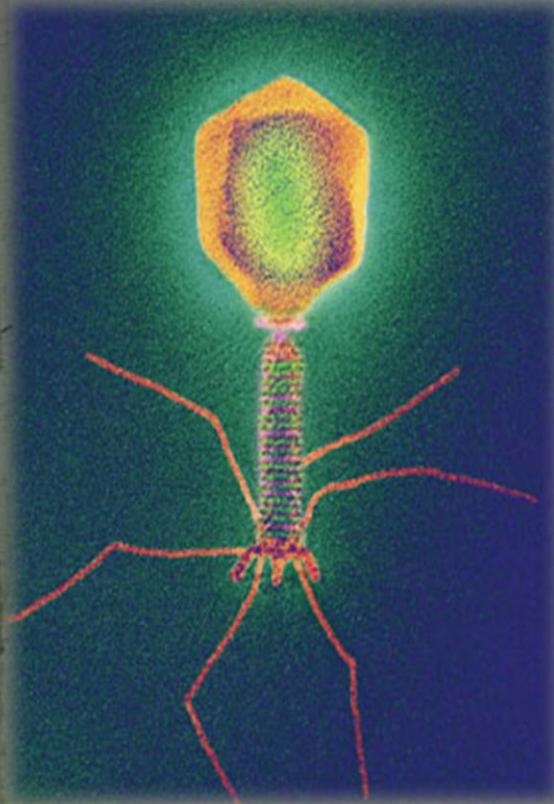


- Д`Эррель (1920) – чумной бактериофаг
- М.П. Покровская (1929) – чумной фаг Покровской
- В.С. Ларина (1970) – фаг Л413 «С» (чумной)



Д`Эррель (1920) – фаг псевдотуберкулезный

Диагностическое значение



На всех этапах бактериологического анализа специфичность выделяемой культуры *Y. pestis* должна быть подтверждена положительной пробой с чумным бактериофагом

Коммерческие бактериофаги:

- чумной фаг Покровской – высокоспецифичен для *Y. pestis*, но лизирует до 25% штаммов *Y. pseudotuberculosis*, что требует определения ДРТФ
- чумной фаг Л413 «С» - видоспецифичен

Широкое распространение явления бактериофагии у *Y. pestis* обуславливает необходимость применения антифаговой сыворотки при выделении чистых культур при исследовании материала в природном очаге

Устойчивость во внешней среде

Чумной микроб неустойчив вне организма теплокровных животных и эктопаразитов. Чувствителен к воздействию физических, химических и биологических факторов. Нагревание его в течение 1 ч убивает его при 60°C, при 100°C – за минуту. Чувствителен к высушиванию, прямым солнечным лучам. Жизнеспособен в воде 1 месяц, молоке – до 3 мес., в земле – до 2 мес. В зараженных блохах – до 396 дней.

Возбудитель чумы чувствителен ко всем широко применяемым дезинфицирующим средствам и антибиотикам.



Материал для исследования

- при кожной форме чумы – содержимое везикул, пустул, карбункулов, отделяемое язв, содержимое плотного инфильтрата, кровь;
- при бубонной – пунктат из бубона, кровь;
- при септической – кровь;
- при легочной – мокрота (слизь из зева), кровь.
- секционный материал – кусочки органов трупа, кровь
- полевой материал - живые грызуны, трупы грызунов, блохи
- вода, воздух, загрязненные вещи, посуда, белье

Забор материала от больных

Забор материала от больных производится медицинскими работниками стационара, где госпитализирован больной, в присутствии и под руководством специалиста по ООИ Роспотребнадзора или противочумных учреждений, вирусологических центров. В случае невозможности быстрого прибытия указанных специалистов забор материала от больного осуществляют два медицинских работника: один из которых должен быть врач-инфекционист или терапевт (хирург), имеющий специальную подготовку по ООИ.



Правила забора клинического материала для лабораторного исследования при подозрении на заболевания чумой

- Общие положения

Материал должен забираться до начала специфического лечения стерильными инструментами в стерильную посуду.

Весь инструментарий и другие предметы, использованные для взятия материала, обеззараживают кипячением в 2% растворе соды (или другого моющего средства) в течение 60 минут с момента закипания или в паровом стерилизаторе (пар под давлением 2,0 кг/кв. см, при 132°C) в течение 90 минут.

Упаковка и транспортировка материала

Каждую пробирку, банку или другую посуду, в которую помещен материал от больного, плотно закрывают резиновыми, корковыми, стеклянными, притертыми пробками, полиэтиленовые или завинчивающимися крышками, обрабатывают снаружи дезраствором. После этого пробки заклеивают лейкопластырем или покрывают колпачком из хлорвиниловой пленки (целлофановой, воощенной бумаги или пергамента) и плотно завязывают.

Затем пробирки помещают в металлический пенал, края между крышкой и корпусом пенала заклеивают лейкопластырем. Пенал заворачивают в целлофановую (вощенную) бумагу, делают пометку "Верх" и помещают в бикс. Каждую банку отдельно заворачивают в хлорвиниловую пленку, целлофановую, вощенную бумагу или марлю и помещают в бикс или металлический ящик, который опечатывают и отправляют в сопровождении 2 человек - один из которых - медицинский работник, в лабораторию специальным транспортом.

К посылке прилагают сопроводительный документ, в котором указывают фамилию, имя, отчество, возраст больного, диагноз, даты начала заболевания и взятия материала, часы забора, характер материала для исследования, примененные антибиотики (дата и доза), фамилию и должность медицинского работника, забравшего материал.

Посылки направляют в лаборатории, имеющие разрешение на работу с соответствующим возбудителем, предусмотренные в комплексном плане по санитарной охране территории.

Лабораторная диагностика *Y. pestis*

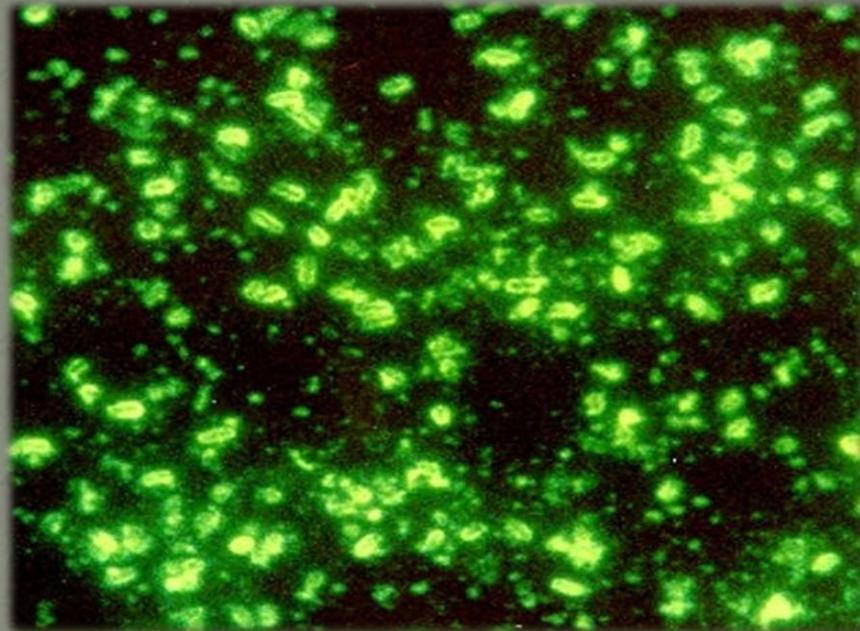


- микробиологические исследования - микроскопия (световая и люминесцентная)
- культуральные методы, исследования основных свойств, включая заражение биопроб
- иммунодиагностика (серология и иммуноферментный анализ)
- генная диагностика

Методы специфической индикации

Обнаружение возбудителя чумы на I этапе исследования по схеме СИ осуществляется при помощи табельных методов:

- МФА
- ИФА (в т.ч. ДИА)
- ПЦР



Дополнительные методы

- Гемагглютинационные тесты (РНГА, РТНГА, РНАт, РНАг)
- Реакция гемагломерации

МИБП для диагностики чумы

Индикация

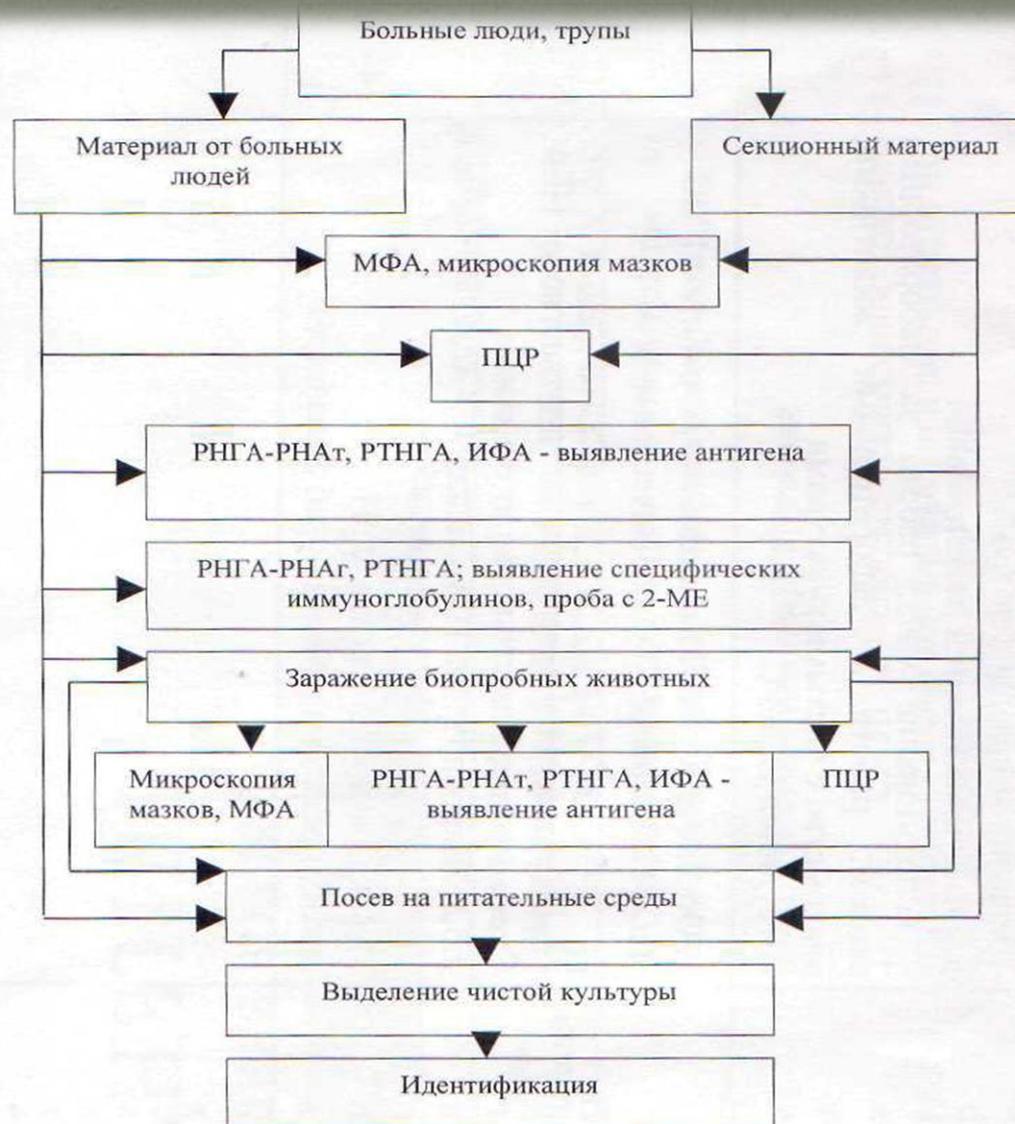
1. Иммуноглобулины чумные флуоресцирующие, РосНИПЧИ «Микроб»
2. ГенПестТест-система для ПЦР метода, РосНИПЧИ «Микроб»

МИБП для диагностики чумы

Экспресс-индикация и идентификация:

- 1. Иммунохроматографический экспресс-тест для выявления и идентификации возбудителя чумы, ФГУН ГНЦ ПМБ г. Оболенск
- 2. Иммуноглобулины чумные адсорбированные для РА, РосНИПЧИ «Микроб»
- 3. Диагностикумы эритроцитарные чумные иммуноглобулиновый и антигенный, НИИМ МО (Киров)
- 4. Тест-система ИФА моноклональная для FI, НИИМ МО (Киров)
- 5. Бактериофаги чумные Л413 и Покровской, «РосНИПЧИ Микроб»

Схема лабораторной диагностики чумы



Материал от больных, свободный от банальной микрофлоры

1-2 часа

«подозрение на чуму,
исследование
продолжается»

- Бактериоскопия, МФА
- ПЦР
- Иммунологические реакции
- Посев на питательные среды
- Постановка биопроб

3-6 часов

Подтверждение
предварительного
положительного ответа

- Учет результатов
иммунологических реакций

18-24 часа

Выделение культуры
чумного микроба,
исследование
продолжается

- Просмотр посевов,
бактериоскопия колоний
- Отсев колоний на сектора
- Определение чувствительности к
бактериофагам и антибиотикам
- Проба на антигенурию

Материал от больных, свободный от банальной микрофлоры

36-48 часов

«выделяющаяся культура чувствительна к чумному б/ф»

- Учет проб с бактериофагом
- Посев на среды Гиса, определение уреазной активности

48-72 часа

«выделяющаяся культура чувствительна к а/б (перечисление)»

- Учет чувствительности к антибиотикам

72 часа

Подтверждение предварительного положительного ответа, данного через 18-24 часа

- Вскрытие биопробы, зараженных внутрибрюшинно нативным материалом (описание патологоанатомической картины, просмотр мазков-отпечатков, посев органов и крови)

Материал от больных, свободный от банальной микрофлоры

96 часов

Окончательное
заключение об
отнесении
выделенной
культуры к виду
Y.pestis

- Просмотр посевов от биопробных животных
- ИФА, РНГА, РНАт с суспензиями органов

Сокращенная схема идентификации возбудителя чумы

- морфология и отношение к окраске по Граму в мазках из нативного материала
- рост на средах
- чувствительность к чумным диагностическим бактериофагам Л-413С, Покровской и псевдотуберкулезному
- отсутствие ферментации мочевины
- наличие Ф₁
- детекция специфической ДНК - ПЦР (при наличии оборудования)
- чувствительность к антибиотикам методом дисков

Дополнительные тесты для окончательной идентификации

- нитрифицирующая и денитрифицирующая способность
- подвижность при 20-22°C
- пестицин-фибринолизин-коагулазная активность
- чувствительность к пестицину
- питательные потребности
- вирулентность для лабораторных животных
- пигментсорбция
- зависимость роста от ионов кальция при 37°C
- и др.

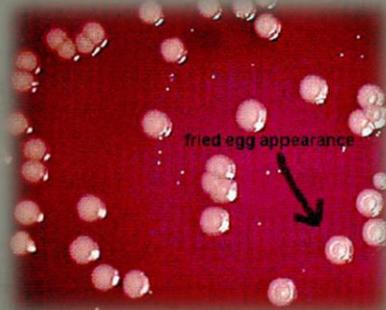
Лабораторная диагностика: определение вирулентности

- Определение вирулентности штаммов *Y.pestis* является обязательным требованием лабораторного исследования

- **In vivo**



- **In vitro**



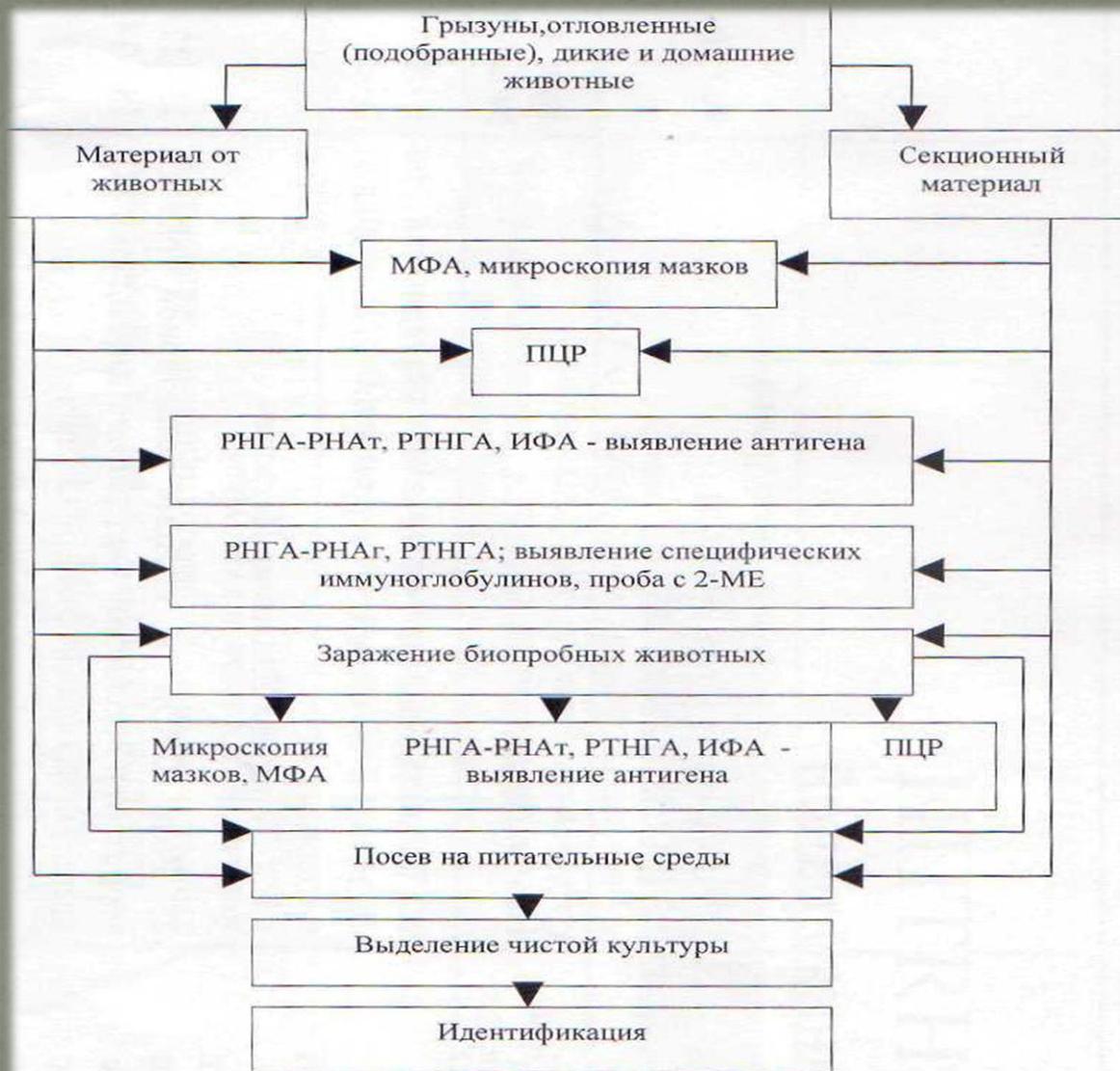
Определение вирулентности штаммов *Y.pestis in vitro*

- кальцийзависимость (Cad^+) роста при 37°C
(среда Higuchi&Smith)
- признак пигментации (Pgm^+)
(среда Jackson&Burrows)

Особенности исследования материала от больных, обсемененного банальной микрофлорой

- посев, в т.ч. от биопробы, на плотные питательные среды с сульфитом натрия (лизированной кровью) и генцианвиолетом
- заражение биопробы: 2 морские свинки и 2-4 белые мыши (н/к; п/к)
- вскрытие биопробы несколько позже – через 72-96 часов – 120-168 часов

Схема лабораторной диагностики чумы



Особенности анализа материала от трупов отловленных и умерщвленных грызунов с явно выраженным комплексом патологоанатомических изменений, характерных для чумы

- исследуют индивидуально
- посев паренхиматозных органов, л/узлов, костного мозга на агар с сульфитом натрия (лизированной кровью)
- посев крови из сердца в бульон
- заражение биопроб: белых мышей или дикие грызуны того же вида (после 30-дневного карантина)
- определение Ф1 в РНГА, РНАт или ИФА

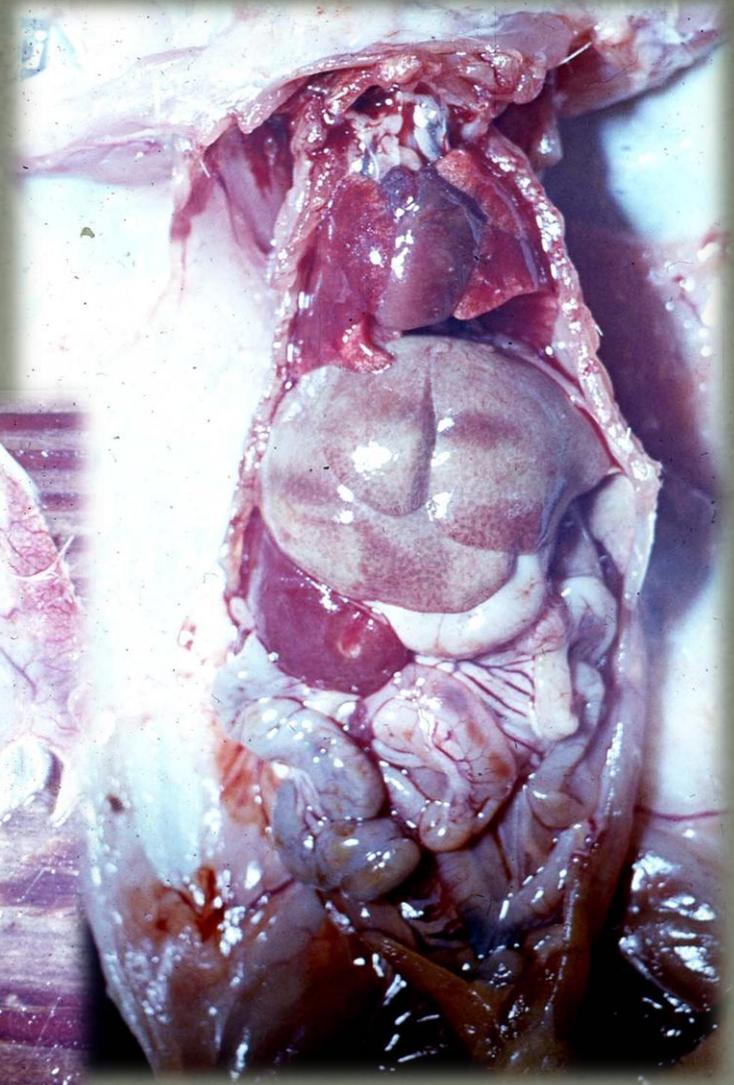
Далее исследуют по схеме анализа свежего трупа без признаков разложения, лежавшего менее 5-6 часов.

Особенности анализа материала от трупов отловленных и умерщвленных грызунов без патологоанатомических изменений, характерных для чумы

Исследуют в соответствии с конкретной обстановкой и поставленной перед обследованием задачей:

- Посевы печени, селезенки, сердца на сектора на селективные среды (возможен групповой посев)
- Постановка групповой биопробы на белых мышах или диких грызунах того же вида (после 30-дневного карантина) н/к или п/к
- При соответствующих показаниях все среды обрабатывают антифаговой сывороткой

Далее исследуют по схеме анализа свежего трупа без признаков разложения, лежавшего менее 5-6 часов.



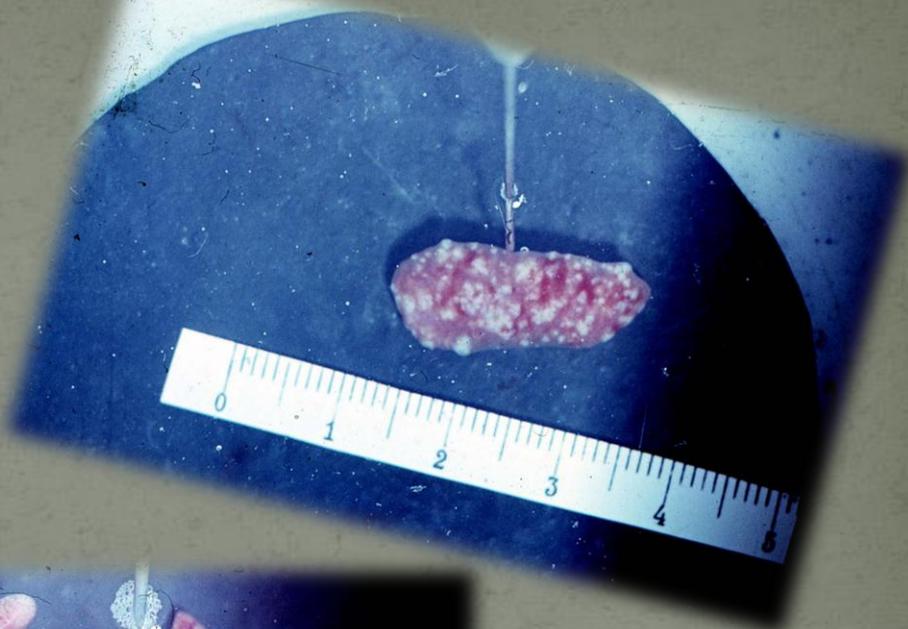
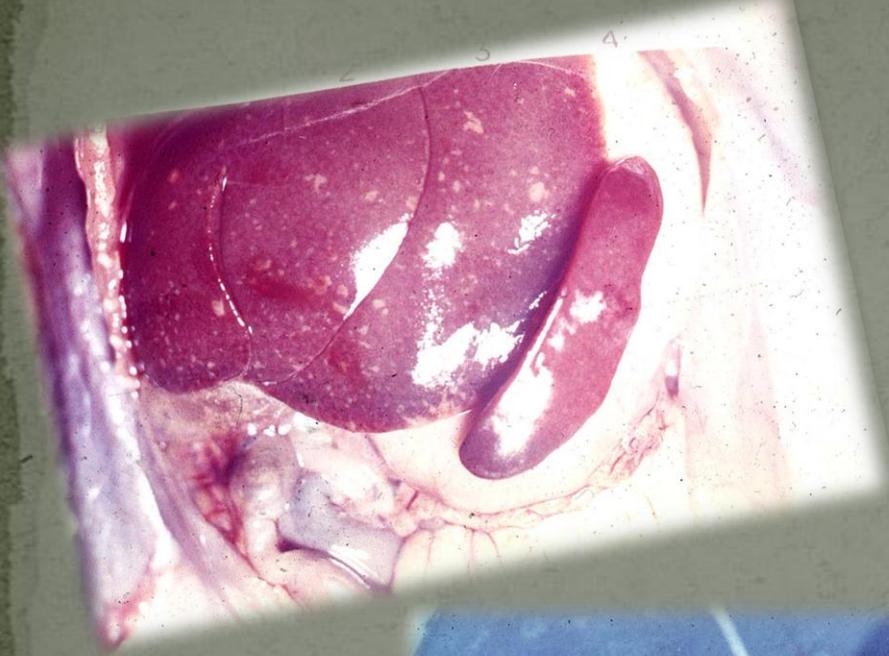
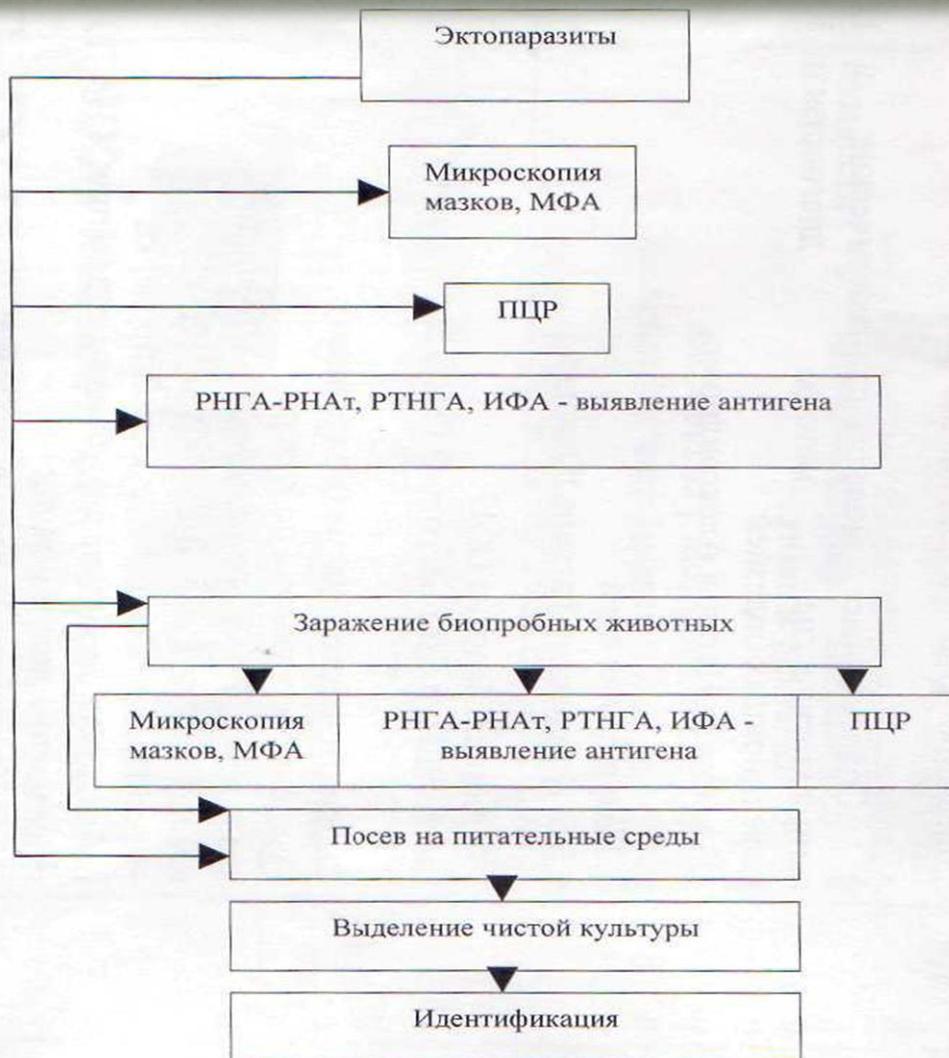


Схема лабораторной диагностики чумы



Особенности исследования эктопаразитов (блох, клещей)

- Обработка 70° спиртом
- Обработка 0,9% натрий хлор
- Приготовление суспензии в стерильной ступке с добавлением 0,5-1,0 мл питательного бульона или антифаговой сыворотки
- Посев на агар Хоттингера (Мартена) с сульфитом натрия (лк), гв или фосфомицином
- В отдельных случаях при конкретных задачах ставят биопробы на б/м подкожно.

Далее исследуют как материал, свободный от банальной микрофлоры

Литература

- Методические указания «Организация и проведение эпидемиологического надзора в природных очагах чумы на территории Российской Федерации». МУ 3.1.1098-02.

Руководство. Специфическая индикация патогенных биологических агентов // Под ред. Г.Г. Онищенко. - М.: 2006.

- Санитарные правила «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)» СП 1.3.1285-03.

- Приказ Роспотребнадзора от 17.11.05 №774 «Об организации и проведении мероприятий по профилактике чумы».

- Санитарно-эпидемиологические правила «Профилактика чумы». СП 3.1.7.1380-03

Руководство. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней // Под ред. Г.Г. Онищенко. - М.: 2008.



Противочумные вакцины

- Живая чумная вакцина (ЖЧВ, Россия) – вакцинный штамм *Y. pestis* EV (pPst⁺, pCad⁺, pFra⁺, Pgm⁻)
(используется в России и ряде других стран)
- Химическая чумная вакцина (ХЧВ, Россия) – капсульный антиген + ОСА
(препарат для ревакцинации прошел Госиспытания)
- Чумная вакцина USP (США) – убитая формалином культура вирулентного штамма *Y. pestis* 195P⁺
(снята с производства)