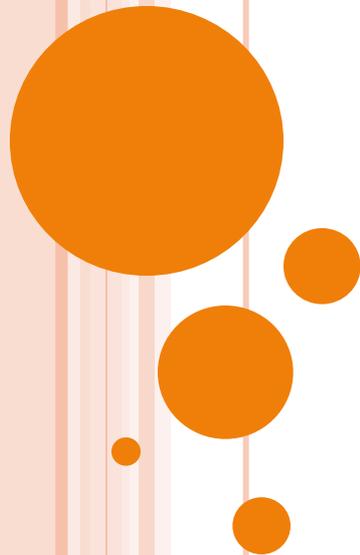


МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ, ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

КНЦКЗИ, д.м.н. Л.Ю. Лухнова



ХАРАКТЕРИСТИКА СИБИРЕЯЗВЕННОГО МИКРОБА

- Сибирская язва – опасное инфекционное заболевание, возбудитель которого способен в определенных условиях образовывать капсулу и споры.
- Вызываемое им заболевание протекает тяжело и скоротечно, нередко заканчиваясь летально, особенно при висцеральной (генерализованной форме).
- Известна с древнейших времен (арабские, римские врачи).
- Россия (Эшке, Ножевщиков) описали клиническую картину.
- Андриевский провел опыт самозаражения.



Впервые микроскопически бациллу сибирской язвы обнаружил немецкий врач Поллендер в 1849 году. При вскрытии коровы им были обнаружены мелкие тельца, прямые и неподвижные.

В 1850 г., французские врачи Казимир Давен (1812–1882) и Райе в крови больных сибирской язвой обнаружили палочки (*Bacillus anthracis*), которые назвал бактериями.

В 1857 в России такие палочки обнаружил проф. Брауэль.

Все они доказывали роль больного животного как источника инфекции.



Давен



ИСТОРИЧЕСКИЕ ФАКТЫ

В 1876 г., немецкий микробиолог **Роберт Кох** (1843–1910 гг.) **впервые получил чистую культуру** возбудителя сибирской язвы, обнаружил споры



ИСТОРИЧЕСКИЕ ФАКТЫ

В 1881 г.,
исследуя сибирскую
язву, Пастер
выяснил, что болезнь
вызывается
специфическими
возбудителями, получил
чистую культуру и начал
делать
вакцинацию против
сибирской язвы среди
сельскохозяйственных
животных.

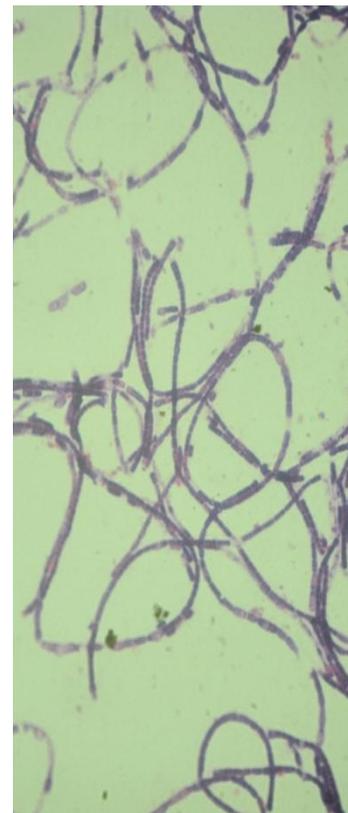


ТАКСОНОМИЯ *BACILLUS ANTHRACIS*

1863 год - официальная дата
открытия возбудителя
возбудителя сибирской язвы

Bacillus anthracis (окраска по
Граму)

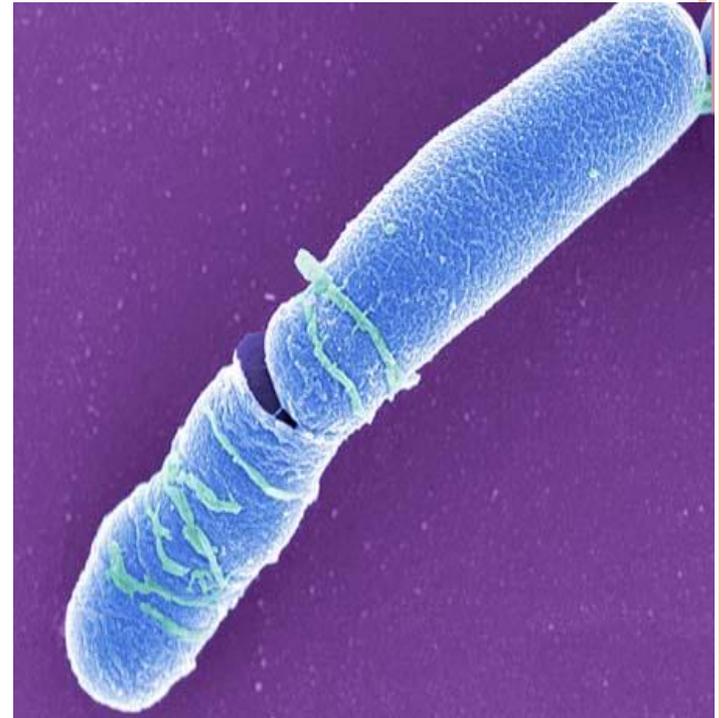
По классификации Берджи (2007)
возбудитель сибирской язвы
относится к
Классу - Schizomycetes
Порядку - *Eubacterialis*
Семейству - *Bacillaceae*
Роду – *Bacillus*
Виду - *Bacillus anthracis*



БЛИЗКОРОДСТВЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ

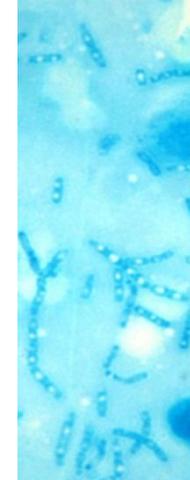
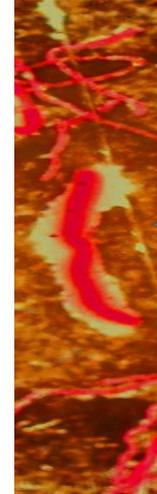
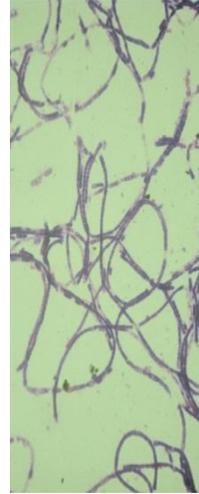
Наиболее близкими к бацилле
антракса являются :

- 1) *B. cereus* (*B. antracoides*, *B. pseudoanthracis*) – восковидная бацилла
- 2) *B. mycoides* – корневидная бацилла
- 3) *B. megaterium* – капустная бацилла
- 4) *B. subtilis* – сенная бацилла
- 5) *B. mesentericus* – картофельная бацилла
- 6) Все они - сапрофиты, кроме *Vacillus cereus*, ферментирующей активный фермент патогенности - лецитиназу и способный давать пищевые токсикозы.



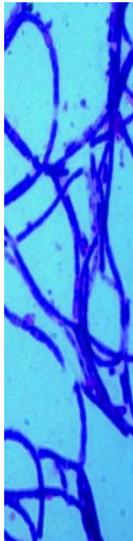
ФОРМЫ СУЩЕСТВОВАНИЯ МИКРОБА СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

- В зависимости от стадии развития, условий внешней среды возбудитель сибирской язвы может существовать в трех формах:
- - вегетативная (без капсулы);
- капсульная;
- споровая



МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА *BACILLUS ANTHRACIS* (ВЕГЕТАТИВНАЯ ФОРМА)

B. anthracis (вегетативная форма) — сравнительно крупная палочка (от 1 — 1,3 до 3—10 мкм), неподвижная, образует капсулы и споры, по Граму красится положительно. Вегетативные клетки могут быть с капсулой и без нее. Споры заключены в хорошо выраженный экзоспориум. Палочки лежат поодиночке или образуют длинные цепочки.

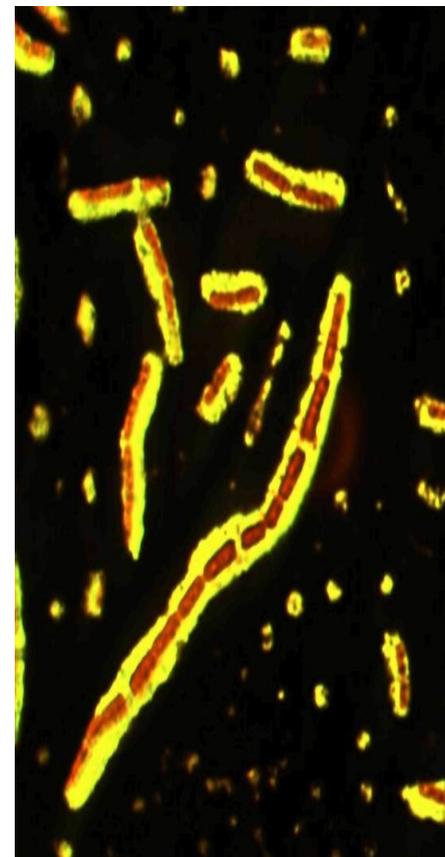
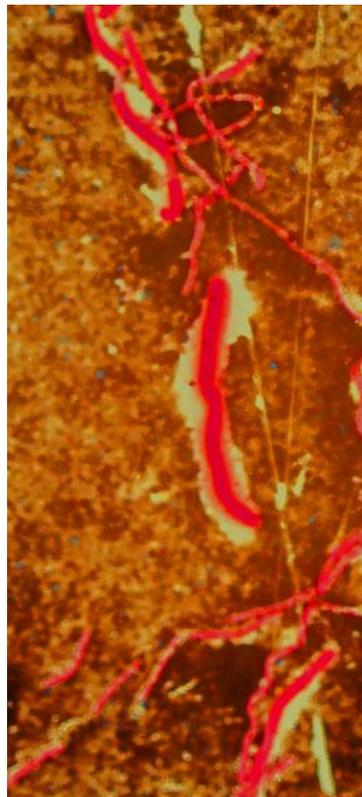


МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА *BACILLUS ANTHRACIS* (КАПСУЛА)

- В организме больного животного или человека, а также на специальных питательных средах, возбудитель сибирской язвы образует **капсулу**.
- В пробах от больных людей или животных, возбудитель расположен парами или в виде коротких цепочек, окруженных общей капсулой (**капсула образуется только в организме человека и животных или на специальных средах с кровью, сывороткой крови**).

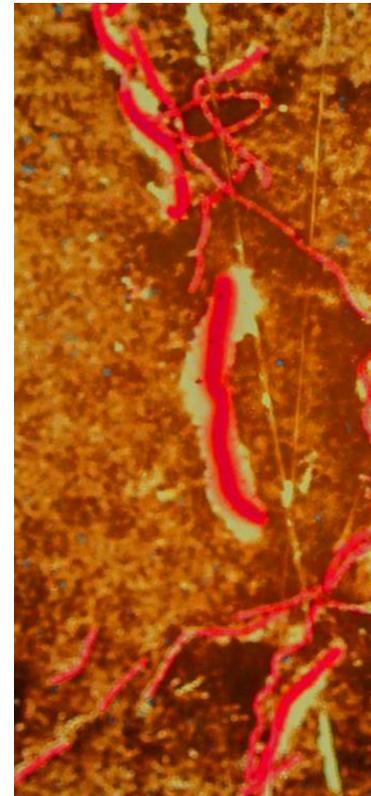
Капсульная форма

В организме человека или животного встречаются как единичные инкапсулированные палочки, так и цепочки, окруженные общей капсулой.



МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА *BACILLUS ANTHRACIS* (КАПСУЛА)

- Капсула образуется через 2-3 час после попадания в организм.
- Капсула это фактор вирулентности, состоит из D-глутаминовой кислоты.
- Капсула определяет патогенность микроба защищает микроб от бактерицидных факторов макроорганизма:
 - 1) способствует фиксации на клетках;
 - 2) препятствует поглощению фагоцитами.
- После фиксации бациллы на клетках макроорганизма, клетка быстро гибнет.



МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА *BACILLUS ANTHRACIS* (СПОРЫ)

Во внешней среде микроб образует споры



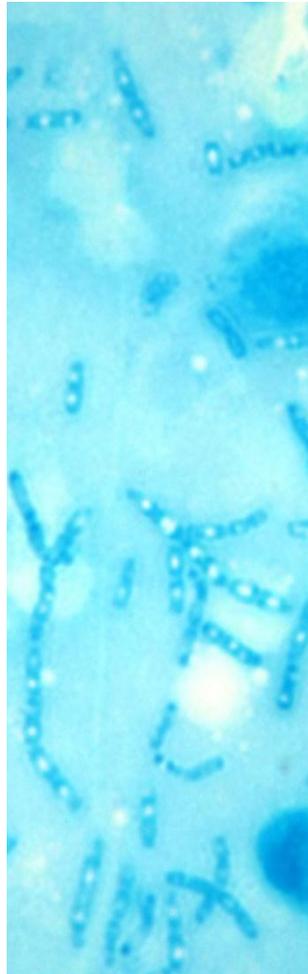
Вне организма человека или животного сибиреязвенные палочки образуют **споры.**

Споры (эндоспоры) - особый тип клеток, характеризующихся резко сниженным уровнем метаболизма и высокой резистентностью к воздействию различных факторов.

У бацилл **споры** являются защитной формой существования. Споры образуются под влиянием неблагоприятной температуры, недостатка влаги или питательных веществ в окружающей среде, необходимых для вегетации.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА *BACILLUS ANTHRACIS*

Bacillus anthracis (окраска спор по Граму - слева), по Михину - справа)



Во внешней среде бацилла сибирской язвы образует *споры*.

Мощная оболочка и корочка (кортекс) защищают спору от внешнего воздействия и позволяет ей долго сохраняться в жизнеспособном состоянии.

- Начало образования спор зависит от особенностей штамма и температуры среды. Начинается быстро. При 30—37 °С оно обычно заканчивается через 1 — 2 ч, при 24°С — через 16 ч, при 18°С затягивается до 70 ч. **Ниже +15°С и выше +42°С спорообразование не происходит.**



МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА *BACILLUS ANTHRACIS*



Резервуаром возбудителя сибирской язвы в природе служит почва, в которой споры сохраняются длительное время.

В зависимости от типов почв до 100 лет, срок не определен

В каждой вегетативной клетке образуется только одна эндоспора, чаще располагающаяся центрально, реже — субтерминально. Споры бациллы овальные, иногда округлые.

Размеры зрелых спор колеблются в пределах 1,2—1,5 мкм в длину и 0,8—1,0 мкм в поперечнике, незрелые споры (проспоры) несколько меньше.



МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА *BACILLUS ANTHRACIS*

- Процесс образования спор проходит ряд последовательных стадий:
- - **подготовительная: изменяется метаболизм, завершается репликация ДНК**, происходит ее конденсация. Клетка содержит два или более нуклеотида, один из которых локализуется в спорогенной зоне, остальные - в цитоплазме спорангия. **Одновременно синтезируется дипиколиевая кислота;**
- - **стадия предспоры:** со стороны цитоплазматической мембраны вегетативной клетки происходит вращение двойной мембраны или септы, отделяющей нуклеоид с участком уплотненной цитоплазмы (спорогенная зона). В **результате этого образуется проспора, окруженная двумя мембранами;**
- - **образование оболочек:** вначале между мембранами проспоры образуется зачаточный пептидогликановый **слой кортекса** и вокруг его наружной мембраны формируется **споровая оболочка;**
- - **созревание споры:** **заканчивается образование всех структур споры, она становится термоустойчивой,** приобретает характерную форму и занимает определенное положение в клетке.



МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА *BACILLUS ANTHRACIS* (СПОРЫ)

- При попадании в благоприятные условия споры прорастают в вегетативные клетки. Этот процесс начинается с поглощения воды и гидратации структур споры. Одновременно активизируются ферменты, и резко возрастает энергия дыхания. Литические ферменты разрушают покровы клетки и пептидогликан кортекса, выделяется наружу дипиколиевая кислота и соли кальция.
- **Спора разрывается, на месте разрыва оболочки споры возникает ростовая трубка и формируется вегетативная клетка.** Оптимальными температурными условиями являются 37^oC, аэрация и наличие необходимых питательных веществ.

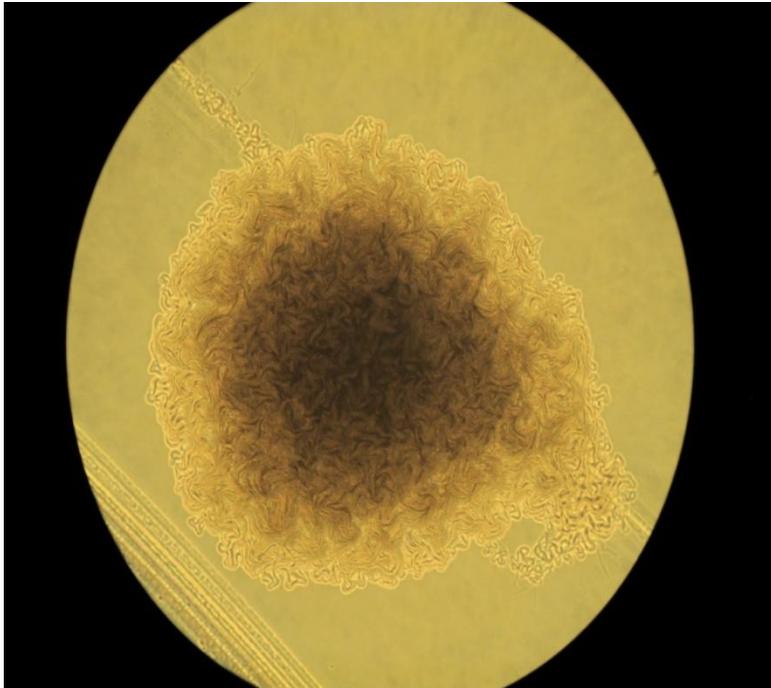


МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА *BACILLUS ANTHRACIS* (СПОРЫ)

- Время прорастания спор занимает несколько часов при 37°C. Длительно хранившиеся споры прорастают за 2-7 часов, недавно образованные - за 60-90 минут. Вирулентность возбудителя зависит от стадии развития (спора, прорастающая спора, вегетативная клетка).
- В опытах на морских свинках показано, что при вдыхании спор 100% животных погибает, проросших спор – 31%, при вдыхании вегетативных клеток заболевание животных не наблюдалось.



КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА *BACILLUS ANTHRACIS*



Возбудитель сибирской язвы
растет на различных средах:

- на мясо-пептонном агаре;
- агаре Хоттингера и др.,
неприхотлив;

Оптимальная температура роста
35-37°C.

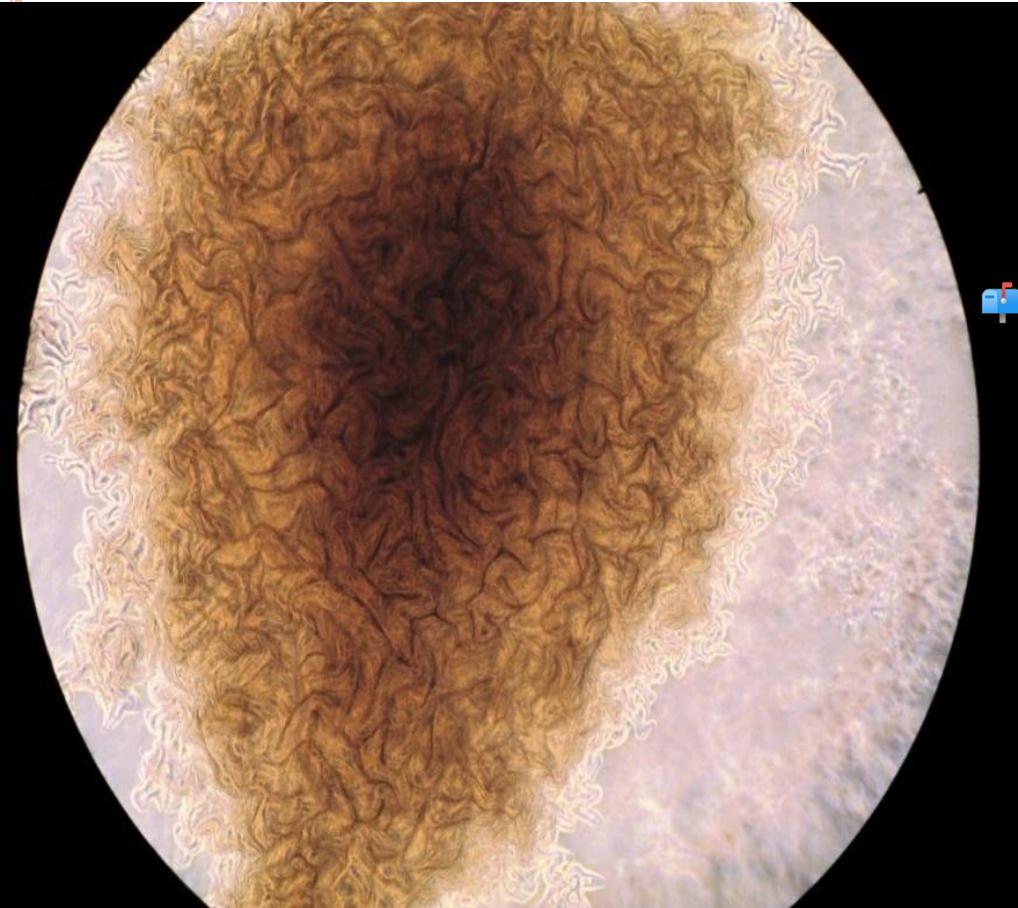
При температуре ниже +12°C и
выше +45°C бациллы не
растут.

- Оптимальная pH среды 7,2-7,6.

Палочка сибирской язвы
является факультативным
аэробом



КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА *BACILLUS ANTHRACIS*



- На поверхности агара при температуре 37°C первые признаки роста появляются через 3 ч с момента посева.

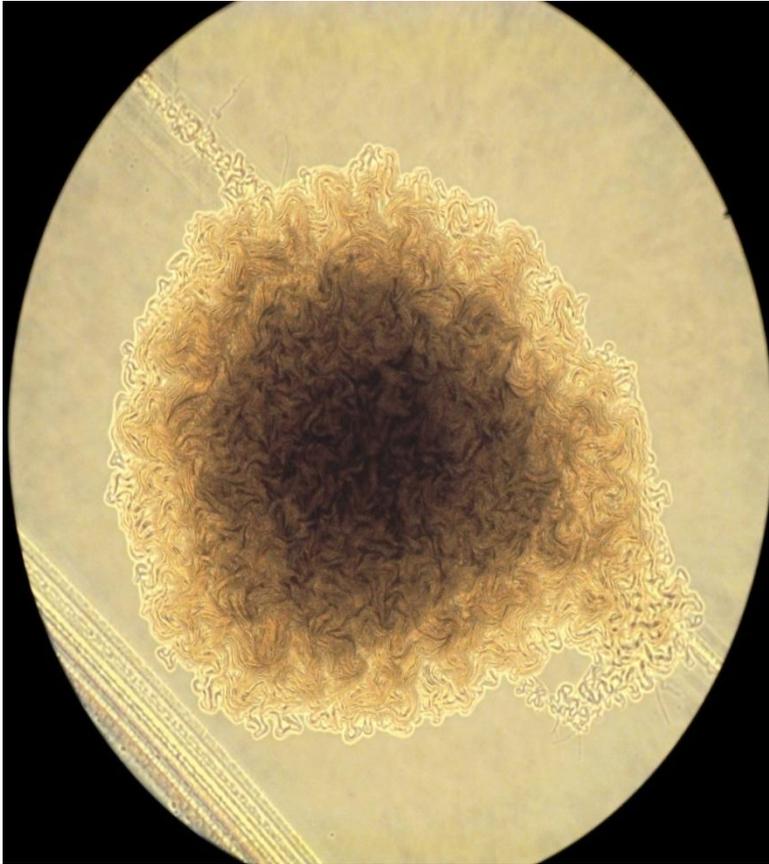
17—24-часовые культуры состоят из серовато-беловатых тонкозернистых колоний с серебристым оттенком, похожих на снежинки.

Диаметр колоний не превышает 3—5 мм. От их краев отходят завитки, косички, которые состоят из параллельно лежащих длинных нитей.

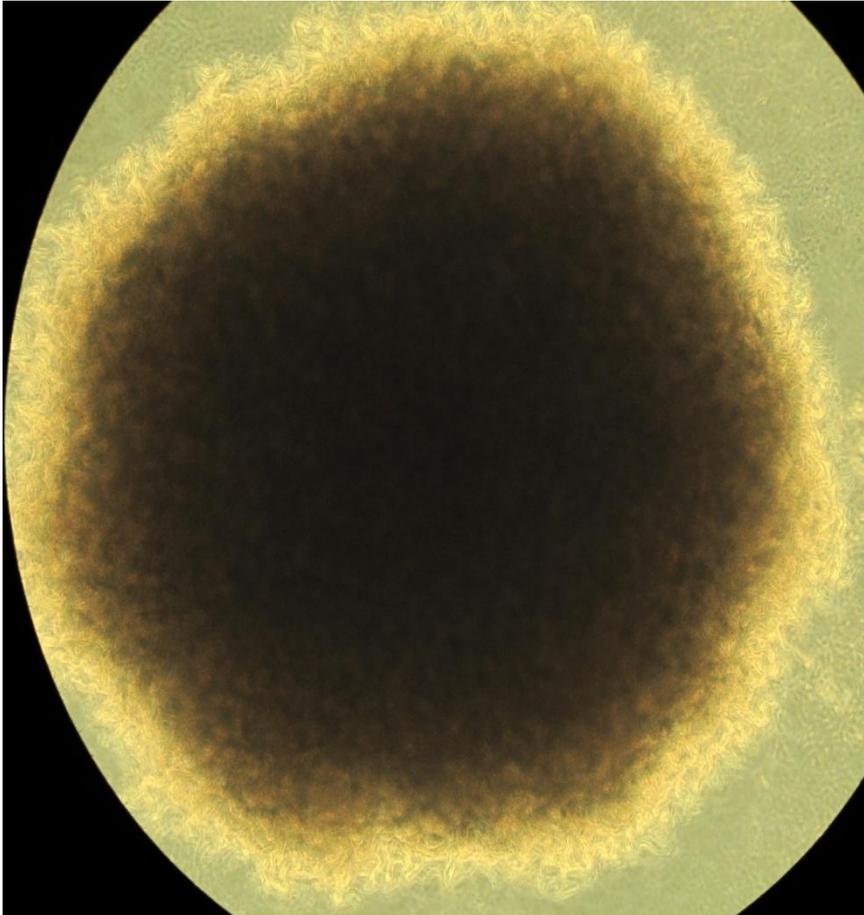


Культуральные свойства *Bacillus anthracis*

Культуры сибиреязвенного микроба на питательном агаре образуют крупные плоские матово - серые шероховатые колонии с неровными краями и бахромчатыми отростками. Встречаются колонии и без отростков.



КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА *BACILLUS ANTHRACIS*



📌 Свойство бациллы образовывать на плотных питательных средах завитки с выходящими за пределы колонии нитями дало повод сравнивать колонии этого микроба с мифической головой Медузы, а также гривой льва.

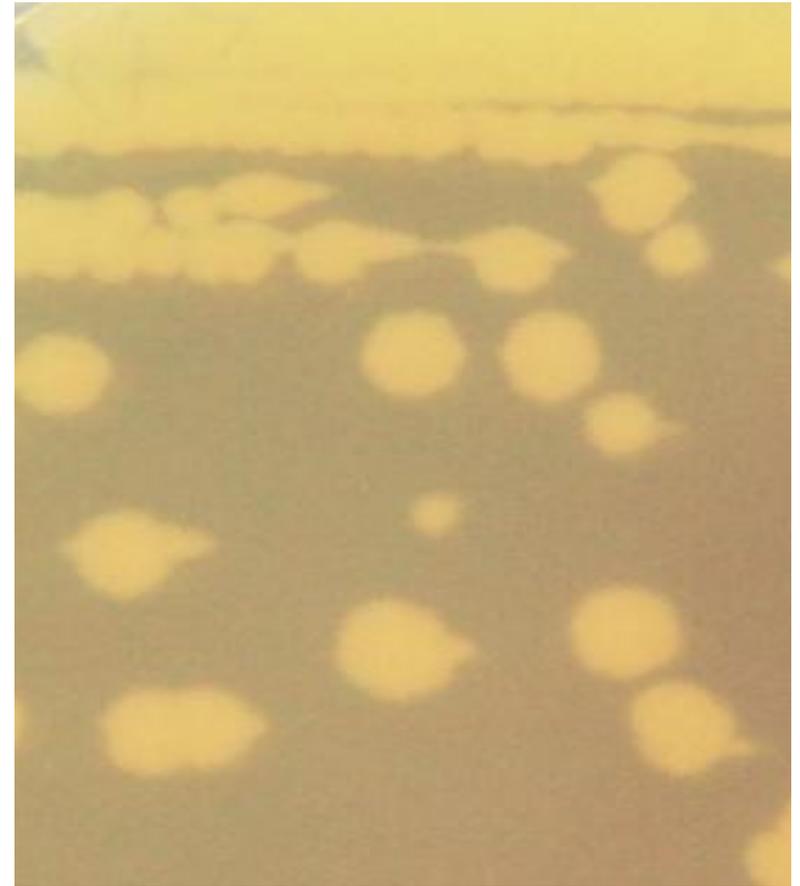
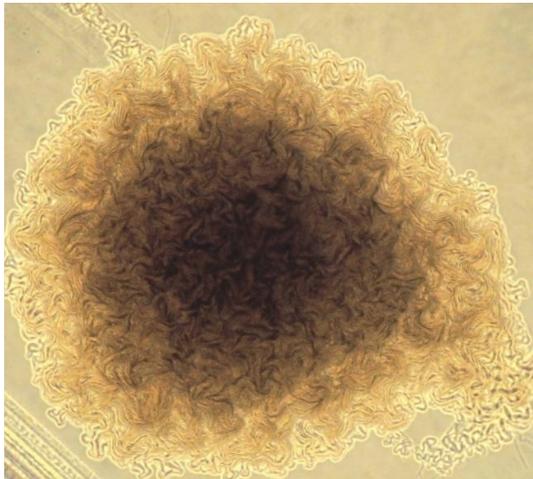
📌 Такие колонии имеют шероховатый рельеф, они характерны для типичных вирулентных штаммов и обозначаются как R-форма.



КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА *BACILLUS ANTHRACIS*

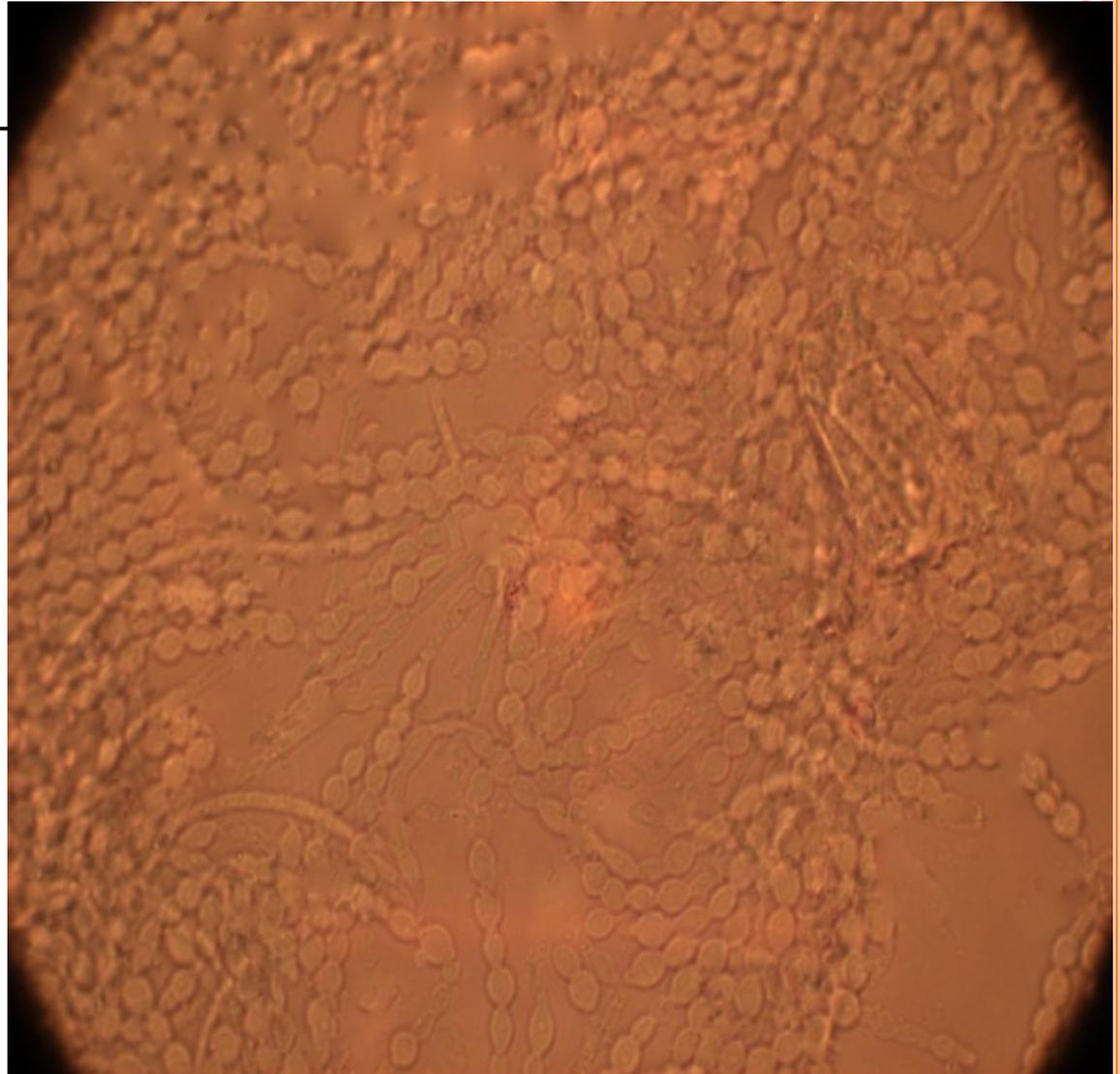
Различают:

- R-формы (шероховатые, вирулентные).
- S-формы (гладкие полупрозрачные колонии;
- 📌 Слизистые, тянутся за петлей (M);
- 📌 - смешанные (SM) колонии.



МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА *BACILLUS ANTHRACIS*

- На агаре, содержащем пенициллин, происходит разрушение клеточных стенок, **образуются шаровидные протопласты в виде цепочек** (“жемчужное ожерелье”).



КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА *BACILLUS ANTHRACIS*



В бульоне и других жидких питательных средах возбудитель сибирской язвы (R - форма) через 16-18 часов инкубации при 37°C на дне пробирки образует рыхлый белый осадок, надосадочная жидкость остается прозрачной, при встряхивании бульон не мутнеет, осадок разбивается на мелкие хлопья.

Ряд штаммов растет в виде нежных отдельных хлопьев, взвешенных в столбике бульона, которые через 48 часов оседают на дно. Некоторые штаммы на 3-4 сутки дают рыхлое пристеночное кольцо по мениску бульона, пленка на поверхности среды не образуется. Агаровые и бульонные культуры некоторых штаммов интенсивно окрашиваются в коричневый цвет вследствие окисления тирозина.



БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА *BACILLUS ANTHRACIS*

- Ферментативная активность достаточно высока: возбудители ферментируют до кислоты глюкозу, сахарозу, фруктозу, мальтозу, крахмал, инулин;
- Синтезирует лецитиназу.
- Очень медленно разжижает желатину (рост в виде перевернутой елочки).
- Микроб не обладает гемолитической активностью (не образует зону гемолиза вокруг колонии).
- Не обладает фосфатазной активностью (колонии не меняют цвет).



БАКТЕРИОФАГИЯ

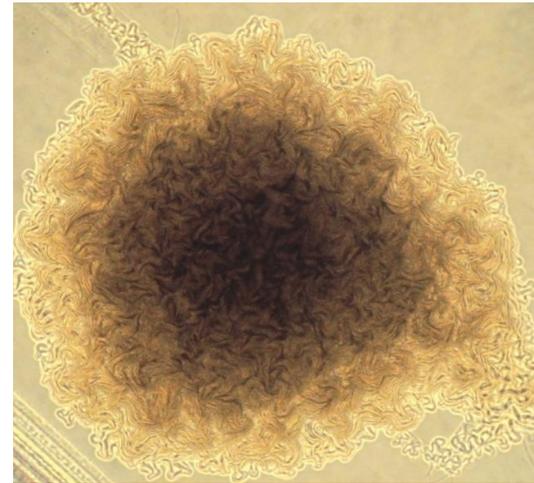
- Бактериофаг впервые открыт в 1898 году Гамалея. Широкое применение имеет в качестве индикатора культур сибиреязвенного микроба.
- Бактериофаги – внутриклеточные паразиты бактерий.
- Бактериофаги могут быть в клетке возбудителя сибирской язвы, близкородственных микроорганизмов, во многих видах окружающей среды, включая сточные воды, шерсть животных, почву и воду вокруг сибиреязвенных трупов или неподалеку от них, а также – почву из неэндемичных районов.



АНТИГЕННАЯ СТРУКТУРА

У возбудителя сибирской язвы имеются следующие антигены:

- 1) полисахаридный комплекс;
- 2) капсульный полипептид;
- 3) экзотоксин, в состав которого входит три компонента — воспалительный (отечный), иммуногенный (протективный антиген) и летальный.



ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ *BACILLUS ANTHRACIS* (КАПСУЛА И ЭКЗОТОКСИН)

- **Капсула** — это наружный слизистый слой бациллы, ее рассматривают как слой эктоплазмы.
- Капсула *B. anthracis* состоит из D-глутаминовой кислоты, образуется в организме.
- Микроб может образовывать капсулу на искусственных питательных средах при выращивании в присутствии повышенного содержания углекислоты (CO₂) в концентрации от 10 до 50 %.
- Возбудитель сибирской язвы продуцирует сильный **экзотоксин**, обуславливающий тяжесть течения болезни. Токсин контролируется плазмидой **pX01**.
- **Сибиреязвенный экзотоксин** представляет собой белковую молекулу, состоящую из трех субъединиц (факторов):
 - **отечный;**
 - **протективный;**
 - **летальный** .
- Отечный фактор (фактор I) вызывает местную воспалительную реакцию - отек и разрушение тканей.
- Протективный фактор (фактор II) - носитель защитных свойств, обладает выраженным иммуногенным действием, так как в ответ на его введение **образуются антитела;**
- Летальный (фактор III) вызывает гибель животных.

ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ *BACILLUS ANTHRACIS* (КАПСУЛА)

Капсула

(синтез контролируется плазмидой pXO2)

- Капсула препятствует фагоцитозу, защищает бациллы от бактерицидного действия жидкостей организма, а также способствует фиксации бациллы на клетках организма, что ведет к резким нарушениям обменных процессов, быстрой их дегенерации и гибели.
- Природные или экспериментальные штаммы, потерявшие плазмиду pXO2, но сохранившие плазмиду токсигенности, становятся слабовирулентными



ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ *BACILLUS ANTHRACIS* (ТОКСИН)

Токсин

(синтез контролируется плазмидой pXO1)

- В молекуле токсина протективный антиген играет **транспортную роль**: сначала соединяется со специфическим клеточным рецептором, потом активируется за счет гидролиза и в результате обретает способность образовывать **мембранные каналы**, чем и обеспечивает **перенос** двух других субъединиц – **отечного и летального факторов** – в клетку организма-хозяина.
- Там эти **токсины** и осуществляют свое цитотоксическое действие: вместе с экзопротеазами вызывают **резкие нарушения клеточного обмена**, приводя к **деградации и гибели клетки**. Токсин вызывает повреждение сосудов с отеком, гемморагиями и тромбозом в результате повышения под действием токсина проницаемости эндотелиальных клеток.



ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АППАРАТ СИБИРЕЯЗВЕННОГО МИКРОБА

- Генетический аппарат сибиреязвенного микроба состоит из хромосомы
- двух плазмид - рХО1, рХО2



Плазмида рХО1 - 181 654 пар нуклеотидов

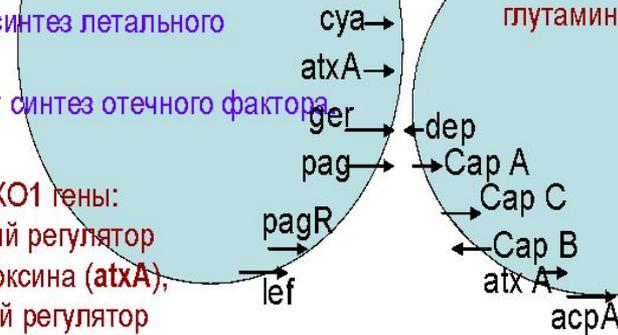
pag кодирует синтез протективного антигена,
lef кодирует синтез летального фактора,
суа кодирует синтез отечного фактора

В плазмиде рХО1 гены: положительный регулятор синтеза экзотоксина (**atxA**), отрицательный регулятор синтеза протективного антигена (**pagR**) и группа генов, обеспечивающих прорастание спор (**ger**);

Плазмида рХО2

96 231 пар нуклеотидов гены (**сарА**, **сарС** и **сарВ**), обеспечивающих образование капсулы, полимеризацию D-глутаминовой кислоты.

В рХО2 гены: положительный регулятор синтеза D-глутаминовой кислоты (**асрА**) и дублированный (**atxA**), а также ген, ограничивающий полимеризацию капсульной субстанции (**dep**).



ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АППАРАТ СИБИРЕЯЗВЕННОГО МИКРОБА

- ▣ **Плазмида pXO1** содержит три гена экзотоксина - *rag*, *lef* и *суа*.
 - ▣ *rag* кодирует синтез протективного антигена,
 - ▣ *lef* - летального фактора,
 - ▣ *суа* - отечного фактора.
- ▣ **Плазмида pXO2** содержит наиболее значимые гены, определяющие синтез капсулы:
 - ▣ Cap A
 - ▣ Cap B
 - ▣ Cap C

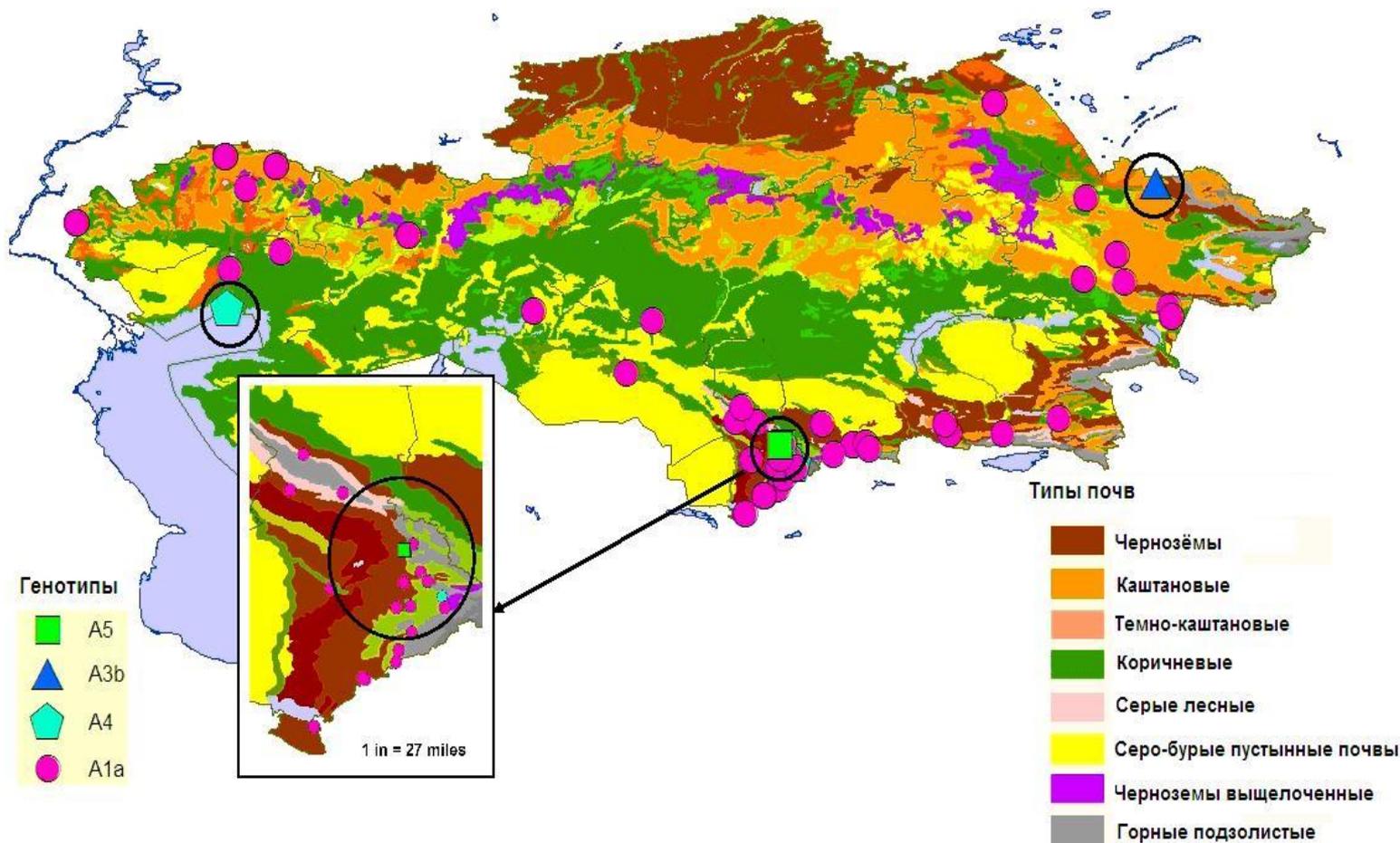


ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АППАРАТ СИБИРЯЗВЕННОГО МИКРОБА

- Возбудитель сибирской язвы до недавнего времени считался мономорфным.
 - В 1996 году у возбудителя сибирской язвы были выявлены маркеры полиморфизма, и обнаружено значительное внутривидовое разнообразие генома *B. anthracis*
- Определено, что различие между штаммами *B. anthracis* обусловлено существованием в геноме бактерий переменного числа тандемных повторов (Variable Number Tandemly Repeats, VNTR).



МЕСТА ВЫДЕЛЕНИЯ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ НА ТЕРРИТОРИИ КАЗАХСТАНА С РАЗЛИЧНЫМ ГЕНОТИПОМ



УСТОЙЧИВОСТЬ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ (ВЕГЕТАТИВНАЯ ФОРМА)

- Вегетативные формы сибирской язвы характеризуются обычной устойчивостью.
 - Бациллы быстро погибают при нагревании до 50 °С в течение 30 мин, при температуре 75 - 80°С - через минуту, а при воздействии различных дезинфицирующих средств - от действия формальдегида, хлора в обычных концентрациях, гибель возбудителя наступает через несколько мин.
- В **невскрытых трупах животных** умерших от сибирской язвы, бациллы погибают в течение **1-8 суток** в зависимости от температуры – 2 С - **11 суток**, при 20 С - **7-8 суток**
- **Хорошо проваренное мясо больного животного не приводит к заражению, если микроб находится в вегетативной форме.**
 - **Рекомендуется хранить мясо при температуре ниже 12 С, т.к. при такой температуре не образуются споры.**
 - **К низкой температуре бациллы сибирской язвы весьма устойчивы.**
- **Минусовые температуры консервируют бациллы. Так, при —10 0 С они выживают 24 дн., при —24 °С — 12 дн., в замороженном мясе при —15 °С — до 15 дн. Они могут сохраняться при температуре жидкого азота (—196°С).**
- **В желудочном соке животных бациллы погибают за 30 мин, в засоленном мясе сохраняются до 15 дн.**
- Свежее молоко обладает бактериостатическими свойствами (оно задерживает развитие бацилл), но действие это сохраняется лишь 24 ч, позднее бациллы начинают размножаться, образуют споры, сохраняя присущую им патогенность.
 - **В воде – до 60 дней.**

УСТОЙЧИВОСТЬ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ (СПОРОВАЯ ФОРМА)

- Споры возбудителя сибирской язвы отличаются высокой устойчивостью.
 - В почве - десятки лет, в воде сохраняются жизнеспособными в течение нескольких лет, засаливание мяса не уничтожает спор.
- **В шерсти животных, шкурах, мясе** — месяцами (180 дней) и даже годами.
- Сухой жар губит их при 140 °С за 1,5 ч, кипячение - через 45-60 мин. Споры устойчивы и к дезинфицирующим средствам.
 - **Засолка мяса не уничтожает споры**
- Десятки лет споры сохраняются на питательном агаре.



УСТОЙЧИВОСТЬ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ (СПОРОВАЯ ФОРМА)

В коллекции Казахского научного центра карантинных и зоонозных инфекций им. М. Айкимбаева имеются штаммы сибирской язвы, выделенные в 1952, 1960, 1969 годах от людей в Алматинской, Атырауской и Кызылординской областях, которые впервые изучены после 40-50-летнего хранения на агаре Хоттингера в запаянных пробирках в условиях холодильника (+4 °С).

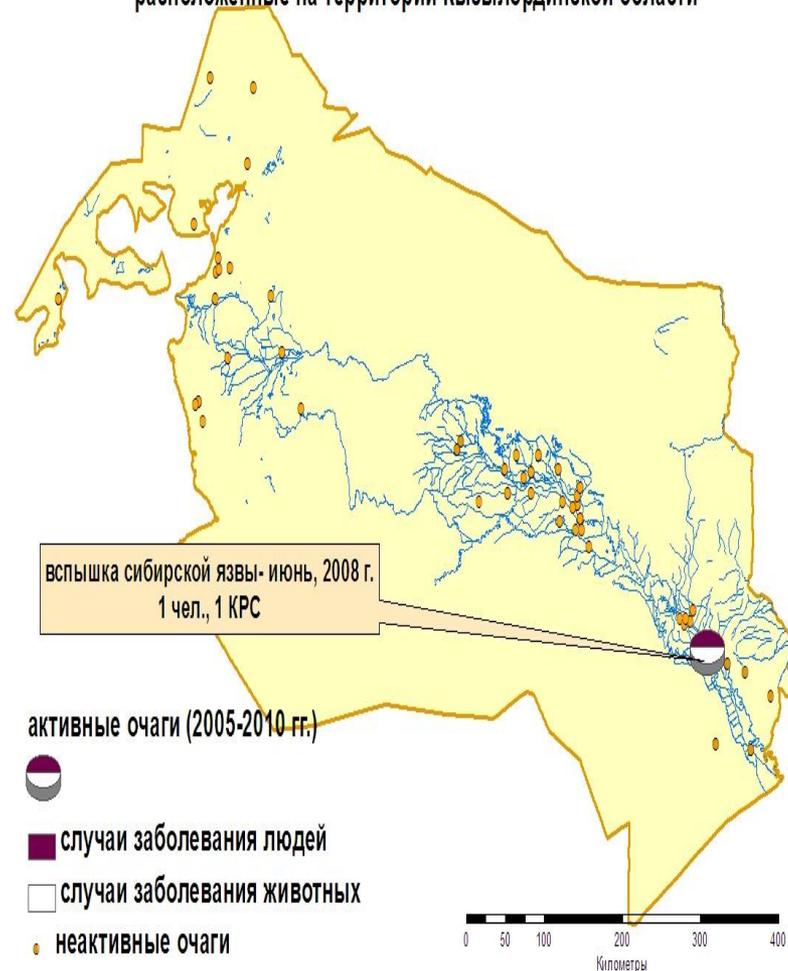
- ▣ Штаммы были типичными по основным биологическим свойствам – образовывали капсулу, споры и были высоковирулентны для лабораторных животных.



УСТОЙЧИВОСТЬ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

- Штаммы возбудителя сибирской язвы образуют споры, что позволяет им неопределенно долго сохраняться в окружающей среде без изменения своих вирулентных и других свойств.
- В 2008 году в Кызылординской области (Шиелинский район), пала от сибирской язвы корова, которую выпасали на территории кладбища, где в 1968 году было произведено захоронение человека, умершего от сибирской язвы. Кладбище не было огорожено, имелось множество нор грызунов, могила была разрыта грызунами.

Очаги, стационарно-неблагополучные по сибирской язве населенные пункты, расположенные на территории Кызылординской области



УСТОЙЧИВОСТЬ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

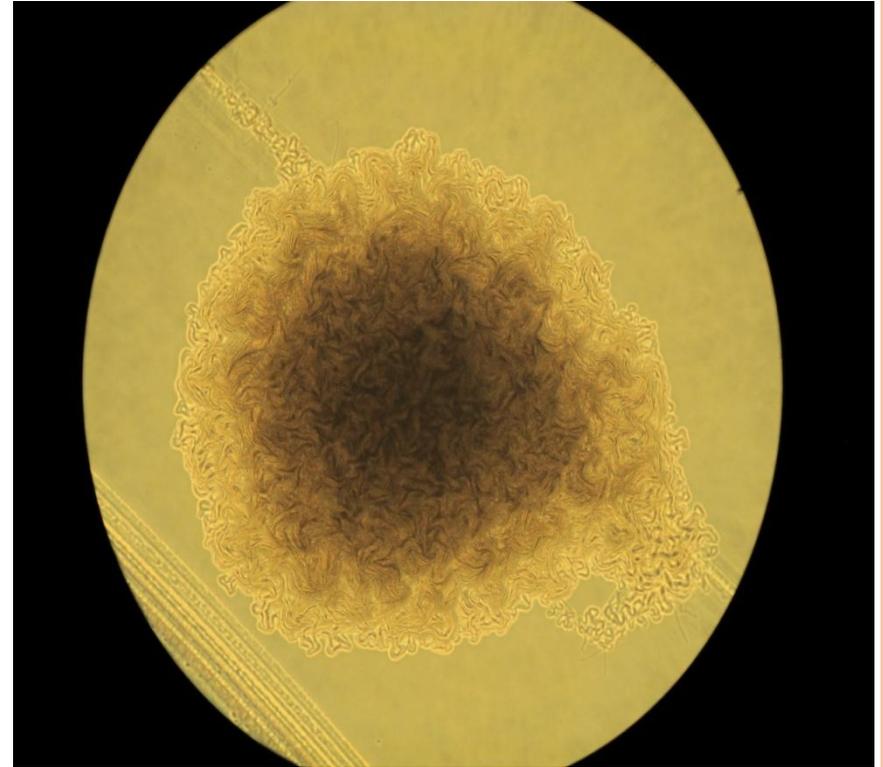
- 📌 В Павлодарской области, на участке «Жана батыр», Аксуского района в 1968 году был падеж сельскохозяйственных животных от сибирской язвы.
- В 2010 году на этом участке было зарегистрировано заболевание сибирской язвой нескольких голов сельскохозяйственных животных.

- Эти и другие факты, свидетельствуют о неопределенно долгом сохранении возбудителя сибирской язвы в почве, без снижения их вирулентных свойств.



ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО – ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ И БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

- На агаре Хоттингера **возбудитель сибирской язвы и близкородственные микроорганизмы** имеют вид плоских матово-серых шероховатых (R-форма) колоний, отличий между ними, как правило, нет.



ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО – ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ И БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

- Бульон Хоттингера после суточного роста сибиреязвенного микроба остается прозрачным, на дне образуется **рыхлый осадок в виде комка ваты**. При встряхивании пробирки бульон не мутнеет, осадок разбивается на **мелкие хлопья**.
- Рост близкородственных микроорганизмов вызывает помутнение бульона.



ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО – ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ И БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ (ФОСФАТАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ)

Штаммы возбудителя
сибирской язвы не
способны вырабатывать
фосфатазу и,
следовательно, разлагать
фенолфталеинфосфат
натрия.

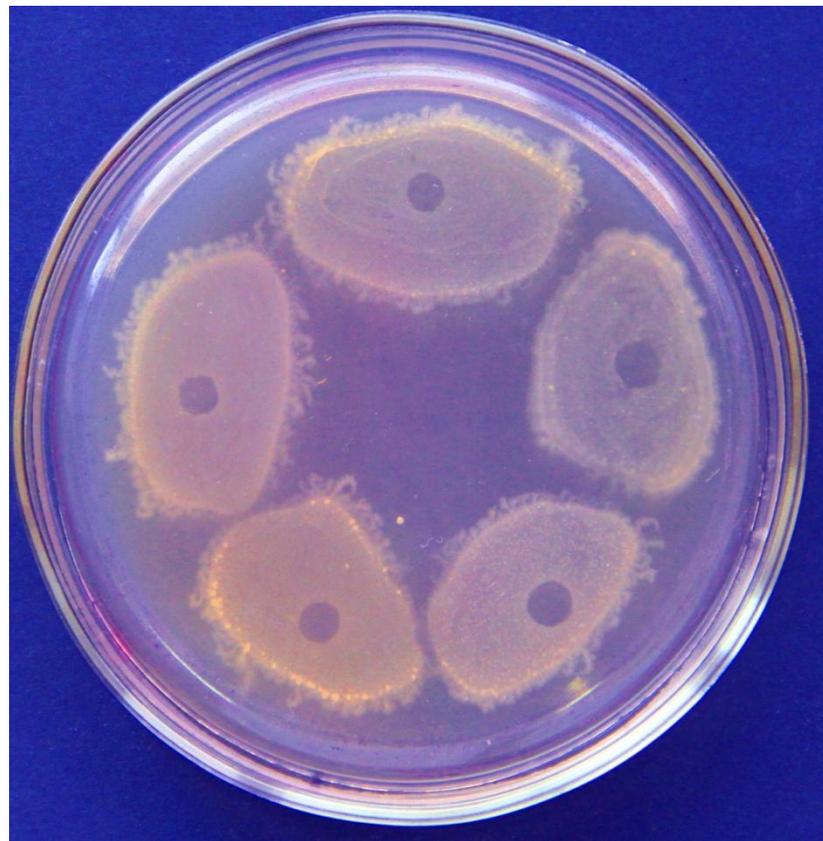
Спорообразующие
сапрофиты разлагают
фенолфталеинфосфат
натрия с образованием
индикатора
фенолфталеина.



ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО – ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ И БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К БАКТЕРИОФАГУ

Чувствительность к действию специфического сибиреязвенного бактериофага является одним из основных критериев, по которым идентифицируют сибиреязвенные культуры.



ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО–ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ И БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К БАКТЕРИОФАГУ

Сибирезязвенный бактериофаг
лизует штаммы возбудителя
сибирской язвы, у
близкородственных штаммов
отсутствует лизис культуры.

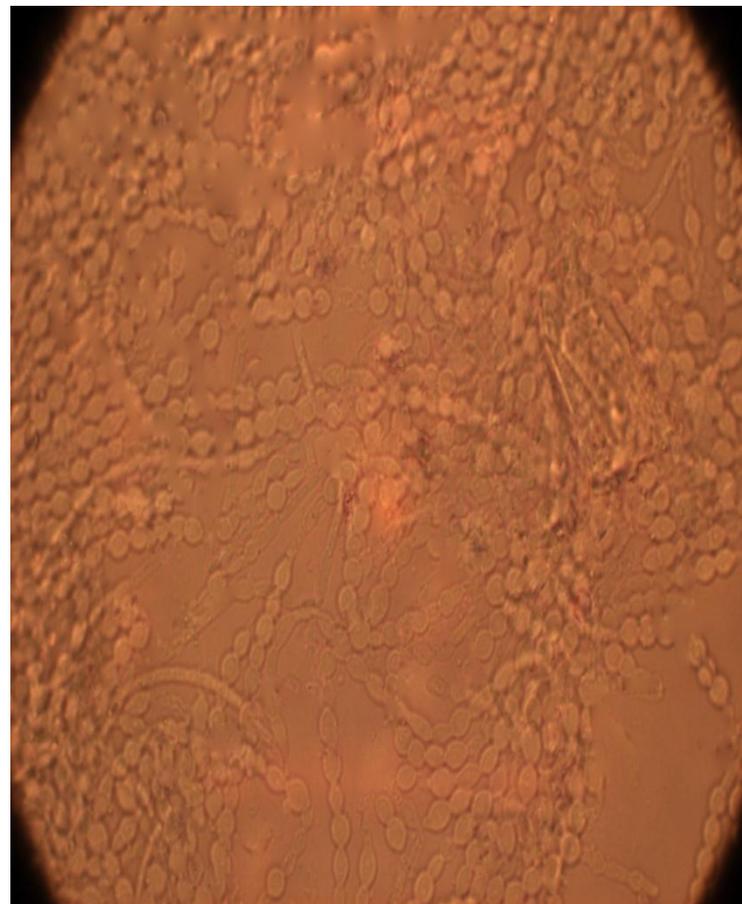


ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО–ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ И БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

ТЕСТ «ЖЕМЧУЖНОЕ ОЖЕРЕЛЬЕ» (КЛАССИЧЕСКИЙ МЕТОД)

Высокую диагностическую
ценность имеет
чувствительный и
специфичный тест
«жемчужного ожерелья». В
доступной литературе нет
сообщений об
отрицательных результатах
теста при исследовании
сибиреязвенных бацилл.

У близкородственных
микробактерий
отрицательный тест
«жемчужного ожерелья».



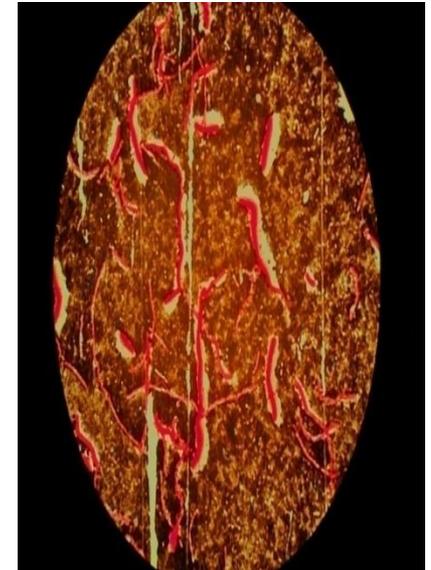
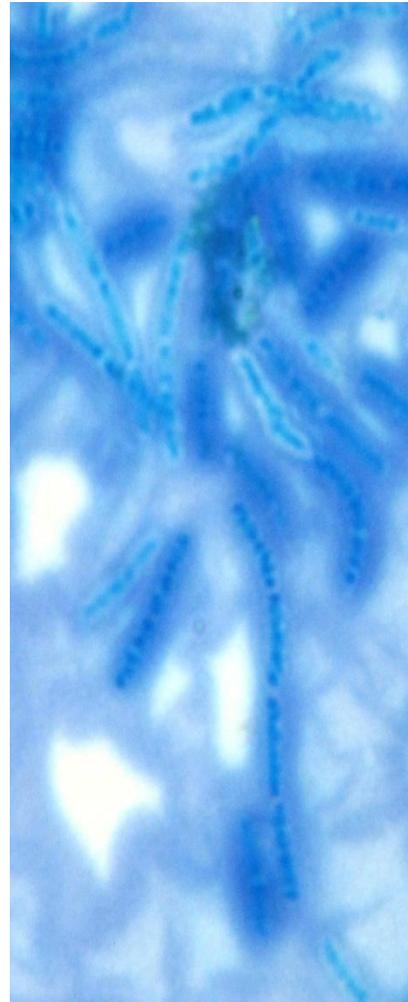
ТЕСТ «ЖЕМЧУЖНОЕ ОЖЕРЕЛЬЕ» (МОДИФИКАЦИЯ ПО ГРУЗ)

Для постановки теста
«жемчужного ожерелья»
используется
классический вариант и
модификация по Груз.



ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО–ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ И БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ. КАПСУЛООБРАЗОВАНИЕ

Одним из факторов патогенности сибиреязвенного микроба является капсула, которая детерминируется плазмидой рХО2. Капсулообразование у сибиреязвенного микроба изучали на сывороточных средах (среда Леффлера) в условиях повышенного содержания СО2 и в организме белых мышей, при последующей окраске мазков по Михину.



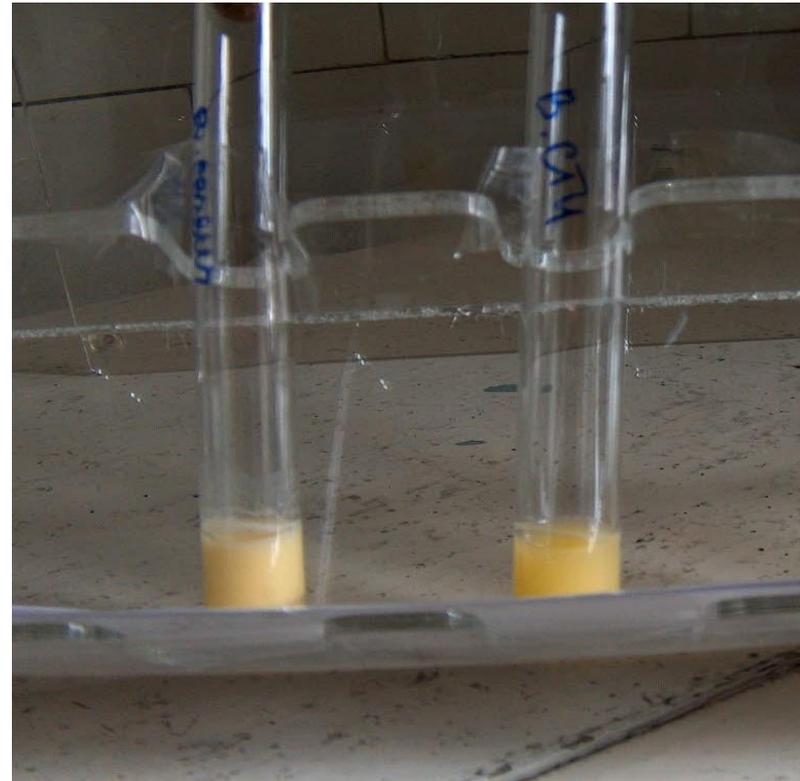
ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО–ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ И БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ. ГЕМОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

□ Гемолитическую активность у штаммов определяют на среде с 5% дефибринированной кровью барана. Сибиреязвенный микроб не образует зоны гемолиза, близкородственные сапрофитные бациллы образует зону просветления вокруг колонии или бляшки (посева).



ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО–ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ И БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ. ЛЕЦИТИНАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ

- ▣ Лецитиназную активность у штаммов определяют в жидкой среде Дрожжевкиной. Сибиреязвенный микроб не свертывает желток, в отличие от близкородственных сапрофитов.



ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО–ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ И БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ.

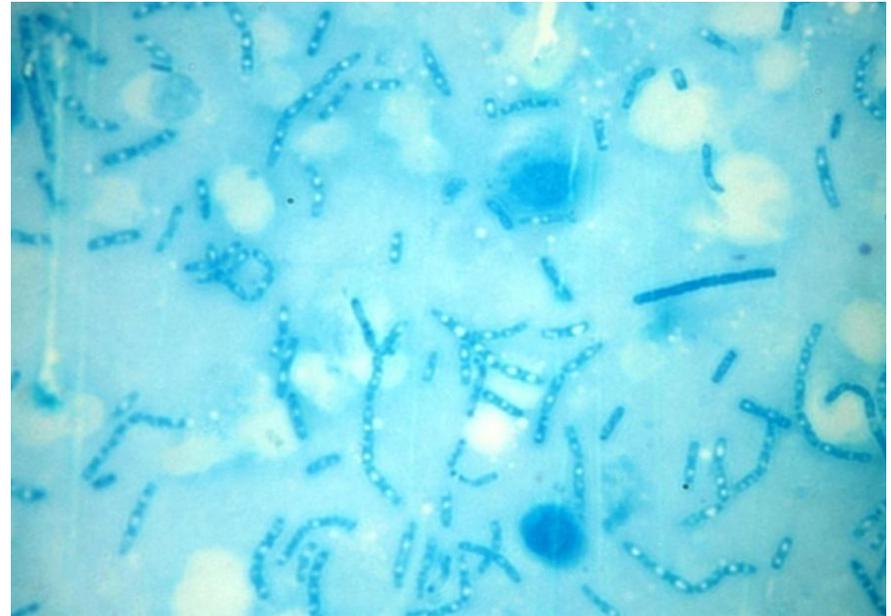
Подвижность штаммов
определяют в
пробирках в 0,4%
полужидком агаре
Хоттингера.

- ▣ Сибиреязвенный микроб неподвижный, в отличии от близкородственных.



ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО–ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ
ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ И БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ.
СПОРООБРАЗОВАНИЕ

Спорообразование у штаммов определяют на агаре Хоттингера, при выращивании испытуемых штаммов в течение 10 дней при комнатной температуре.



ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИРУЛЕНТНОСТИ

- Определение вирулентности сибиреязвенных культур проводят на белых мышах и кроликах. Степень вирулентности *B. anthracis*, определяют по дозе, вызвавшей гибель кроликов:
 - высоко вирулентные штаммы вызывают гибель кроликов при введении 10 тысяч спор;
 - умеренно вирулентные – при введении 100 тысяч спор и 1 млн;
 - слабовирулентные и авирулентные штаммы не вызывают гибели кроликов в указанных дозах. Летальную дозу определяют на белых мышах.



ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ У СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ И ИЗ ОБЪЕКТОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ





Аэрозоль образуется при любой деятельности, передающей энергию жидкости или материалу

Работа в лаборатории с возбудителем сибирской язвы сопряжена с неизбежным контактом персонала с различными видами биологических материалов, что является риском заражения возбудителем *B. anthracis*.



Для заражения человека требуется доза в 10000 м.к.



ПУТИ И ФАКТОРЫ ПЕРЕДАЧИ ВОЗБУДИТЕЛЯ *BACILLUS ANTHRACIS* ПРИ РАБОТЕ В ЛАБОРАТОРИИ

Источник: *Bacillus anthracis*

(любой инфекционный материал)

Лабораторные процедуры:

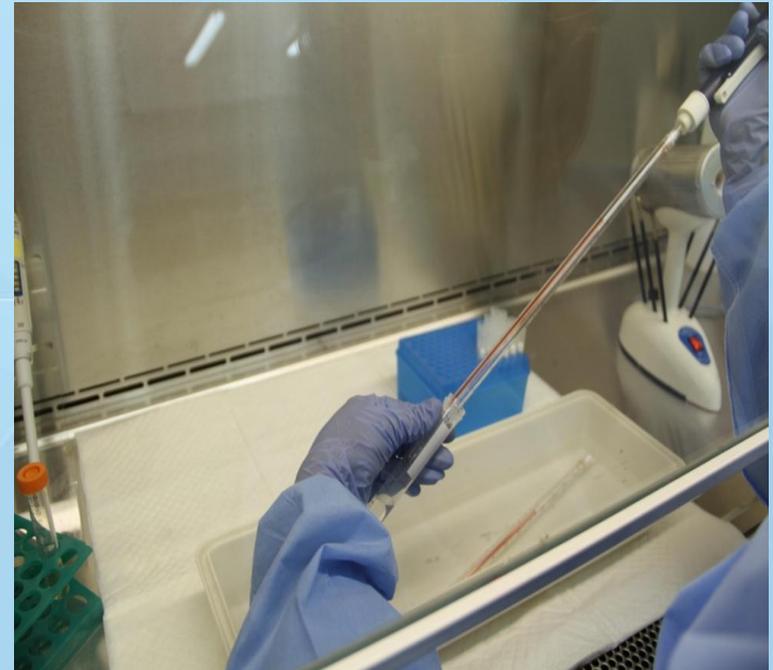
- 1) посевы на среды;
- 2) пипетирование;
- 3) заражение животных;
- 4) заражение членистоногих;
- 4) центрифугирование

Пути передачи:

- 1) контактный;
- 2) воздушно-капельный;
- 3) алиментарный;
- 4) трансмиссивный.

Факторы передачи:

- 1) объекты с посевами *B.anthraxis*;
- 2) бактериальная аэрозоль;
- 3) зараженные лабораторные животные;
- 4) зараженные членистоногие



ВЫСОКИЙ РИСК ЗАРАЖЕНИЯ ЧЕЛОВЕКА ВОЗБУДИТЕЛЕМ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ В ЛАБОРАТОРИИ

1) Контактный (прямой контакт)



- 1) при заражении лабораторных животных, уходе за ними (аэрозоль, укусы, нанесение царапин);
- 2) при вскрытии лабораторных животных, взятие крови (прямое воздействие возбудителя на кожу, слизистые оболочки);
- 3) при пипетировании (пролипании и разбрызгивании заразного материала);
- 4) при центрифугировании;
- 5) вскрытии ампул;
- 6) при попадании в рот;
- 7) при вдыхании бактериального аэрозоля (при аварии);
- 8) при укусе насекомыми

2) Алиментарный



3) Аэрозольный



4) Трансмиссивный



ИССЛЕДОВАНИЕ МАТЕРИАЛА НА НАЛИЧИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

Исследование на сибирскую язву включает:

- Подготовку проб;

- Микроскопию мазков исходного материала;
- Посевы на питательные среды;
- Постановку биопробы;
- Постановку серологических и генетических реакций;
- Идентификацию микроорганизмов;

- У свиней - постановку антракسينовой пробы.



ПОРЯДОК ВЗЯТИЯ МАТЕРИАЛА ОТ ЖИВОТНЫХ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ НА НАЛИЧИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ

В случае падежа животного в лабораторию направляют ухо и мазок, полученный из надреза уха. Ухо отрезают с той стороны, на которой лежит труп. Предварительно ухо туго перевязывают шпагатом. Место отреза уха на трупе прижигают.

- Если подозрение на сибирскую язву возникло при вскрытии трупа животного или в ходе вынужденного убоя, все манипуляции по вскрытию прекращают и на исследование направляют кровь, кусочки органов (селезенка, печень, лимфатические узлы, в которых имеются характерные патологоанатомические изменения), костный мозг (из грудины или канала бедренной кости).



ПОРЯДОК ВЗЯТИЯ МАТЕРИАЛА ОТ ЖИВОТНЫХ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ НА НАЛИЧИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ

- От трупов свиней в обязательном порядке отбирают **заглочные лимфатические узлы** и участки отечной соединительной ткани.
- У животных с подозрением на заболевание или больных берут на исследование **кровь с помощью шприца из яремной вены или из вены уха, а у свиней - из вены хвоста**. В отдельных случаях у животных берут на исследования пробы каловых масс.



ВЗЯТИЕ МАТЕРИАЛА ПРОДОВОЛЬСТВЕННОГО СЫРЬЯ И ПРОДУКТОВ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ НА НАЛИЧИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ

- Исследованию подлежит мясо, мясные продукты, кожа, шерсть и др.:
- **Мясо и мясные продукты.** Из материала, доставленного на исследование, отбирают образцы весом 10 – 30 г, из мяса - участки с лимфоидной тканью или кровоизлияниями.
- **Шерсть.** Шерсть для исследования отбирают из разных мест, не менее 5 образцов массой около 2 г каждый (брать пучки загрязненной шерсти). Если шерсть упакована в кипы, берут не менее 10 образцов из разных мест каждой кипы, а также скопившуюся внутри обшивки пыль. Образцы от одной кипы объединяют и упаковывают вместе.
- **Кожа и кожсырье.** Берут кусочки кожи размером 3х3 см с периферических не загнивших и не заплесневевших участков шкурок. При наличии на внутренней стороне шкурки кровоподтеков или инфильтратов пробы берут и в этих местах.



ВОЗРАЖЕНИЕ МАТЕРИАЛАМИ ОБЪЕКТОВ СКИ УЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ.
ИССЛЕДОВАНИЮ ПОДЛЕЖИТ ПОЧВА, ТРАВА, ФУРАЖ, ПОДСТИЛКА,
ВОДА И Т. Д.;

- Почва. Пробы почвы с мест вероятного обсеменения спорами возбудителя (**мест вынужденного убоя скота, стоянок и водопоя животных**) берут на глубине до **15 см**, на территории **почвенных очагов сибирской язвы** - на глубине до **2 м** с помощью почвенных буров.
- При этом при заборе проб с большой территории обследуемую площадь разбивают на **квадратные участки со стороной не более 4 м**. В каждом квадрате намечают **4 точки по краям и одну посередине**, откуда производят отбор проб почвенным буром.



ВЗЯТИЕ МАТЕРИАЛА ИЗ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ (ПОЧВА)

- Перед взятием почвы на территории почвенного очага сибирской язвы и пробы берут на глубину до **1,5 – 2,0 м через каждые 25 см, объемом не менее 100 - 200 г в пробе.**
- Особое внимание обращают на костные и другие животные остатки, которые также отбираются для исследования.
- Пробы упаковываются в том же порядке.
- Каждую пробу весом около 100 – 200 г помещают в мешочек из плотной ткани с завязками или в лабораторную посуду (широкогорлый флакон, банку), закрытую такой же тканью.
- Нельзя помещать пробы почвы в полиэтиленовые мешки или в плотно закрытую посуду, так как в этих условиях происходит бурное развитие актиномицетов, губительно действующих на возбудителя сибирской язвы.



ВЗЯТИЕ МАТЕРИАЛА ИЗ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ (ПОЧВА)

- ▣ Вынутую из глубины и не использованную для проб почву с целью обеззараживания смешивают с сухой хлорной известью, содержащей 25% активного хлора, в соотношении 1 часть хлорной извести на 3 части почвы, слегка увлажняют и сбрасывают в шурф.
- ▣ Место отбора проб дезинфицируют раствором хлорной извести, содержащей 5% активного хлора, инструменты - огнем паяльной лампы.



ВЗЯТИЕ МАТЕРИАЛА ИЗ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ (ПОЧВА)

- Вода. Пробы воды из естественных и искусственных водоемов берут у поверхности (на глубине 10 – 15 см) и у дна при помощи батометра или специально приспособленной бутылки. Объем каждой пробы не менее 0,5 л, общий объем не менее 1 л.
- Кроме того, берут пробы придонного осадка у береговой кромки, которые исследуют так же как пробы почвы.



ВЗЯТИЕ МАТЕРИАЛА ИЗ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ (СМЫВЫ)

- Смывы с объектов внешней среды. Смывы делают с мест наиболее вероятного обсеменения спорами возбудителя с помощью стерильного тампона, смоченного
- стерильной дистиллированной водой. Площадь смыва одним тампоном около 100 см². Затем тампоны помещают в пробирки, заливают стерильной дистиллированной водой (15 мл) и закрывают пробкой.



ВЗЯТИЕ МАТЕРИАЛА ИЗ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ (КОРМА)

- В лабораторию направляют среднюю пробу, которую составляют из хорошо перемешанных первичных проб данной партии, емкости и т.п. Масса средней пробы должна быть не менее 500 г.



ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ МАТЕРИАЛА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ НА НАЛИЧИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

- Патологический материал для исследования помещают в стерильную посуду (пробирки, банки или другую лабораторную посуду).
- Транспортирование и хранение биологического материала для исследования должны осуществляться с соблюдением "холодовой цепи":
- Допускается только однократное замораживание - оттаивание материала.

□



ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ МАТЕРИАЛА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ НА НАЛИЧИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

- Пробы почвы, кормов и других сыпучих объектов помещают в сухую стеклянную банку.

- Пробы воды наливают в стерильные одноразовые (многократные) флаконы, нумеруют, упаковывают во влагонепроницаемую тару, которую обвязывают, пломбируют.
- Пробы материала и сопроводительные документы доставляются нарочным на спецтранспорте.



ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ МАТЕРИАЛА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ НА НАЛИЧИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

- В сопроводительной к пробам записке указывают причину проведения исследования, какой материал и в каком количестве направляют, место и дату отбора материала.
- Для проб шерсти и кормов дополнительно указывают происхождение, объем партии, вид упаковки и количество упаковочных единиц.
- Прилагают опись с указанием места отбора каждой пробы, указать географические координаты.



ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Лабораторное исследование патологического материала включает:

- Подготовку проб к исследованию
- Микроскопическое исследование исходного материала
- Посев на питательные среды
- Заражение лабораторных животных
- Постановку серологических реакций с целью обнаружения антигенов и антител, ПЦР
- **Идентификацию выделенных культур**

Сроки исследования:

- Микроскопический - в день поступления
- Бактериологический - до трех суток
- Биологический - до 10 суток

ПОДГОТОВКА ПРОБ К ИССЛЕДОВАНИЮ (МЯСО, ОРГАНЫ, ТКАНИ)

- Кусочки проб мяса, органов и тканей от трупов помещают в ступку, измельчают ножницами или пестиком, затем заливают стерильным 0,9%-м раствором натрия хлорида в соотношении 1:10, суспензию через марлевый тампон набирают в шприц или пипетку и переносят в пробирку или колбу, объем пробы доводят до 15 – 20 мл 0,9%-го раствором натрия хлорида.



ПОДГОТОВКА ПРОБ К ИССЛЕДОВАНИЮ (ВОДА)

- Воду с илистыми частицами фильтруют через 3 слоя марли. Чистую воду исследуют без предварительной подготовки.
- С целью концентрирования микробов пробы воды можно профильтровать через мембранные фильтры или осадить центрифугированием при 6000 об/мин в течение 15 минут.
- Осадок с каждого фильтра соскабливают скальпелем (или фильтры измельчают стерильными ножницами), затем заливают 1 – 2 мл 0,9%-го раствора натрия хлорида. Осадок после центрифугирования также суспендируют в 15 – 20 мл 0,9%-го раствора натрия хлорида.

□



ПОДГОТОВКА ПРОБ К ИССЛЕДОВАНИЮ (ПОЧВА)

- Пробы почвы освобождают от корней, камней и тщательно перемешивают. От каждой пробы берут 90 – 100 г почвы, помещают в колбу, заливают стерильным 0,9%-м раствором натрия хлорида из расчета получения 15 – 20 мл суспензии.
- Колбу закрывают, тщательно встряхивают в течение 5 – 10 мин, дают отстояться 3 – 5 минут и надосадочную жидкость переносят в пробирку для исследования.
- Различные порошкообразные вещества, в том числе пищевые продукты и корма, обрабатывают аналогично почве, используя в дальнейшем для исследования надосадочную жидкость или раствор в случае растворения вещества, объем пробы доводят до 15-20 мл раствором хлорида натрия.



ПОДГОТОВКА ПРОБ К ИССЛЕДОВАНИЮ (ШКУРА)

- Для проб из шкур кусочки массой в 1 г помещают в фарфоровую ступку и заливают стерильным 0,9%-м раствором натрия хлорида из расчета 1:10. Кусочки измельчают ножницами и оставляют при 20°С на 2 – 3 часа для размягчения материала. После этого пробы хорошо растирают пестиком в той же жидкости до получения волокнистой мезги, мезгу удаляют, предварительно отжав ее пестиком на внутренней боковой поверхности ступки. Объем пробы должен быть не менее 15 – 20 мл.
- От каждой пробы шерсти отбирают наиболее загрязненные части, измельчают ножницами, вместе с пылью помещают в колбу и заливают стерильным 0,9%-м раствором натрия хлорида (15 – 20 мл). Колбу закрывают, тщательно встряхивают в течение 5 – 10 мин. Для освобождения от грубых частиц взвесь можно профильтровать через 2 – 3 слоя марли.



ПОДГОТОВКА ПРОБ К ИССЛЕДОВАНИЮ

- Незагрязненный материал (кровь, экссудат) не прогревают.
- Загрязненный материал: (кусочки органов, трупный материал, объекты внешней среды, воду) делят на две части. Одну часть перед исследованием прогревают при 80°С – 15 (или 56° С – 30 минут) (гретая проба), для удаления возможной вегетативной флоры.

ИССЛЕДОВАНИЕ МАТЕРИАЛА

Незагрязненный материал (кровь, экссудат).

Пробы от больных животных, из патологического материала, мяса животных, где возбудитель сибирской язвы находится в вегетативной форме, не прогревают.

Бактериоскопическое исследование

Исследование доставленного материала начинают сразу (**без предварительной подготовки**) с бактериоскопии. Готовят несколько мазков. Окраску проводят по **Граму, люминесцирующей сывороткой, Михину, Гинс-Бури** или другим методом для обнаружения капсулы.

Бактериологическое исследование

Материал сразу засевают на питательные среды (агар Хоттингера (5-7 чашек), ДДС-агар (5-7 чашек), бульон Хоттингера, 5-7 пробирок).

ИССЛЕДОВАНИЕ МАТЕРИАЛА

Загрязненный материал: (кусочки органов, трупный материал, объекты внешней среды, воду) делят на две части.

1. Одну часть перед исследованием прогревают **при 80⁰С –15 (или 56⁰ С - 30 минут) (гретая проба) Для** удаления возможной вегетативной флоры.

2. Другая часть исследуется без предварительного прогревания (не гретая проба).

(Возможно в пробе имеются только вегетативные клетки)

ИССЛЕДОВАНИЕ МАТЕРИАЛА

1. Не гретая проба

Готовят мазки и:

- окрашивают **по Граму, люминесцирующей сывороткой;**
- засевают на питательные среды: агар Хоттингера (5-7 чашек), дифференциально-диагностический агар (**ДДС-агар, 3-5 чашек**);
- заражают **2 – х белых мышей** подкожно по 0,2-0,5 мл.
- ставят серологические реакции. Для этого в часть пробы добавляют 2% формализированный раствор хлорида натрия в соотношении 1:5. Через два часа инкубации при комнатной температуре прогревают при 56⁰С 30 минут и исследуют на наличие специфического антигена, кровь исследуют на наличие специфических антител.
- Полимеразную цепную реакцию (ПЦР);

2. Гретая проба

После прогрева пробу исследуют также как и негретую.

Исследование можно проводить без центрифугирования и фильтрации!!!!.

СЕРОЛОГИЧЕСКОЕ И ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

- РНГА, РНАГ, РТНГА, ИФА, МФА, реакция преципитации по Асколи;
- ПЦР



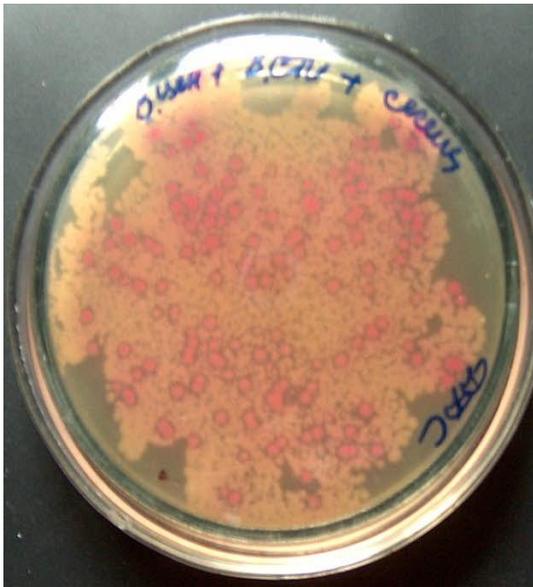
ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

Через 18-24 часа инкубации посевов из исследуемого материала на агаре Хоттингера в термостате при 37⁰С, отбирают колонии для идентификации в первую очередь те, которые имеют морфологию, характерную для возбудителя сибирской язвы.

Кроме таких колоний следует отбирать любые шероховатые колонии с тем, чтобы количество их с каждого исследуемого посева было не менее 10, а с ДДС - агара снимают все колонии, которые не изменили цвет после обработки парами аммиака.



ФОСФАТАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ (БЕСЦВЕТНЫЕ КОЛОНИИ –
BACILLUS ANTHRACIS, ОКРАШЕННЫЕ – BACILLUS CEREUS



До добавления аммиака

После добавления аммиака



ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

Колонии отсевают на питательный агар и после инкубации идентифицируют по следующим признакам (тестам):

1. Морфология микроба - крупная палочка, образующая капсулу и спору. Вегетативная форма бациллы сибирской язвы окрашивается по Граму положительно, но в молодых и старых клетках встречаются и грамотрицательные клетки



ПРИГОТОВЛЕНИЕ МАЗКОВ И ФИКСИРУЮЩЕЙ ЖИДКОСТИ

- Готовят несколько мазков, высушивают на воздухе, затем фиксируют в фиксирующей жидкости. Экспозиция не менее 30 минут.
- Фиксирующая жидкость состоит из 180 мл этилового спирта и 20 мл 33% пергидроля. Хранится во флаконе с притертой крышкой в темном месте.
- **Годна в течение месяца с момента изготовления.**



ОКРАСКА ПО ГРАМУ

На предметное стекло с фиксированным и обеззараженным мазком, помещают полоску Фильтровальной бумаги, предварительно пропитанной карболовым кристалвиолетом, наливают воду.

Экспозиция -2 мин.
Убирают фильтровальную бумагу.
Мазок промывают водой.
Наливают на мазок раствор Люголя.

Экспозиция - 2 мин. Раствор смывают, мазок промывают водой.
Наливают на мазок этиловый спирт 96⁰С и обесцвечивают им мазок в течение 30 секунд, снова обильно промывают водой.
Докрашивают мазок фуксином Пффейфера в течение 1 мин.
Промывают водой, просушивают.



ТЕСТ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАПСУЛООБРАЗОВАНИЯ

▣ *Приготовление среды Леффлера*

1. Для приготовления среды Леффлера в стерильные пробирки разливают по 4,0 - 5,5 мл нормальной лошадиной сыворотки. Пробирки загружают в аппарат Коха и скашивают при 80⁰С в течение 1 часа. Затем быстро (для образования конденсата) помещают в холодильник. Среда длительное время хранится в холодильнике.

▣ 2. Для выявления капсулообразования в среду Леффлера делают посев суточной исследуемой культуры (сначала в конденсат, а затем по штриху). Посевы помещают в эксикатор. Далее исследование идет по стандартной методике.

3. Пробирки помещают в эксикатор, на дно которого помещают кислоту (10 мл) и соду в разных емкостях (30 г).

Эксикатор закрывают, при этом притертые поверхности краев эксикатора и крышки должны быть предварительно смазаны тонким слоем ланолина (вазелина). Эксикатор с посевами помещают в термостат при 37⁰С.

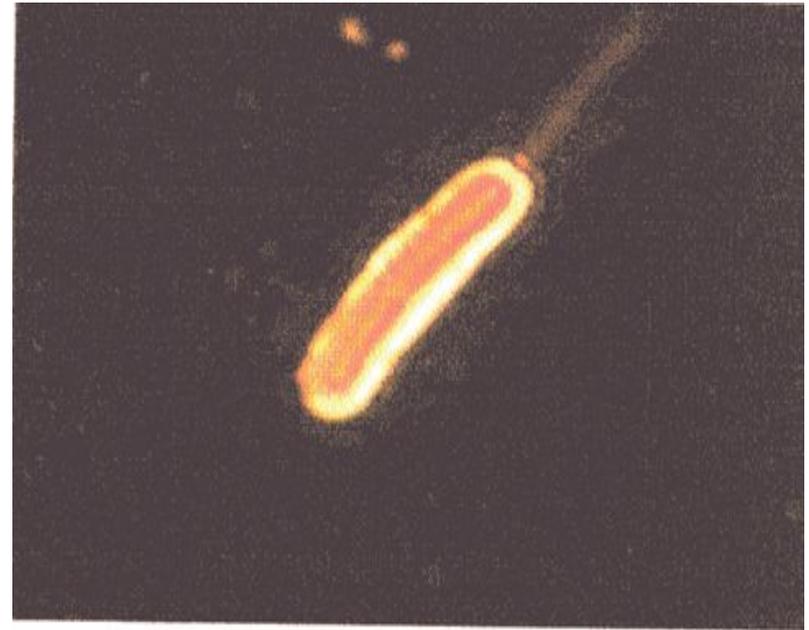
Наклоняя эксикатор, выливаем кислоту на соду, в результате чего образуется углекислый газ.

4. *Учет результатов.* Через 16-20 часов инкубации из посева готовят на предметных стеклах мазки, фиксируют. Затем окрашивают одним из методов для выявления капсулы.

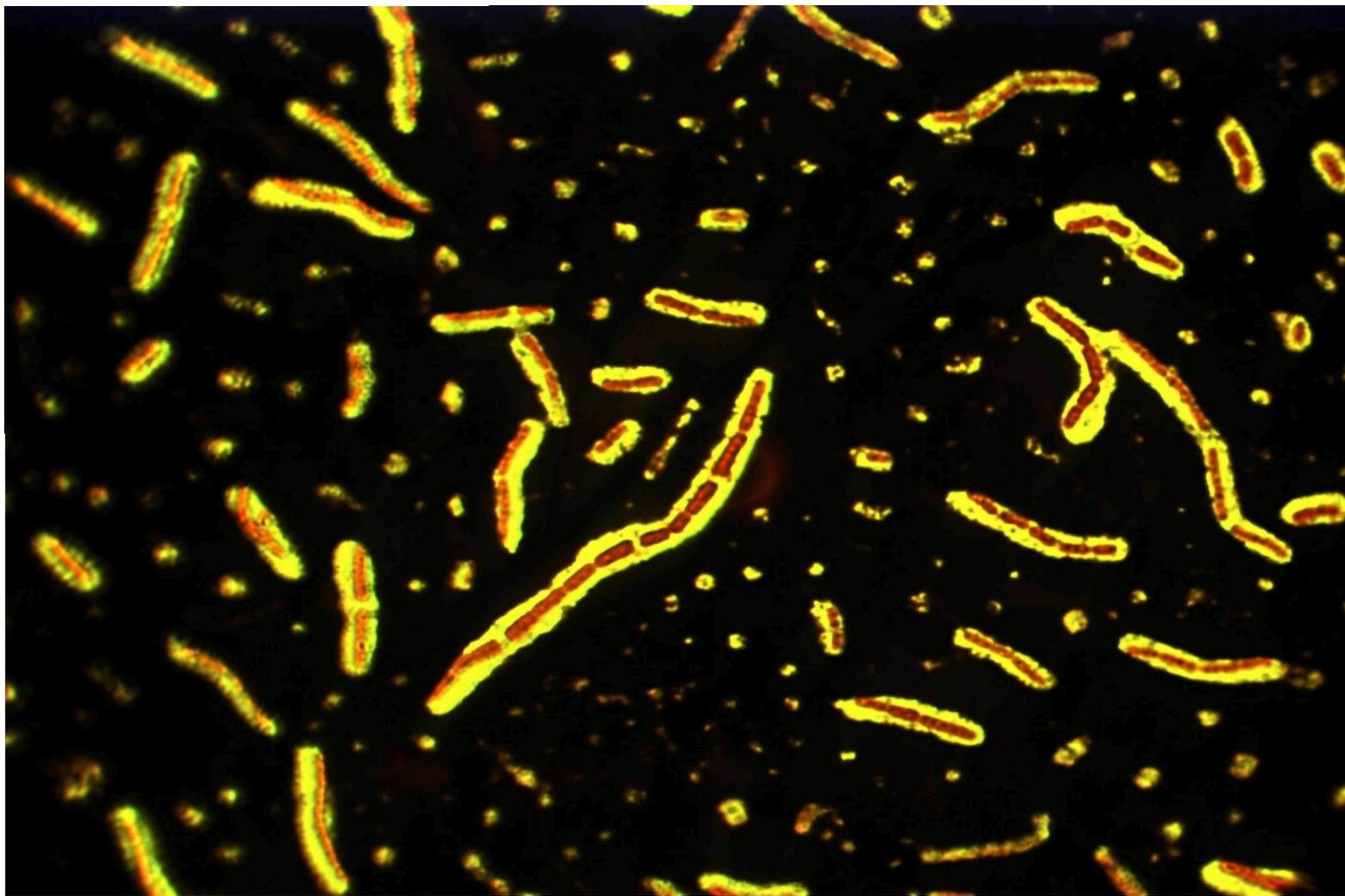


СПОСОБ ОКРАСКИ КАПСУЛ ПО ГИНС-БУРРИ

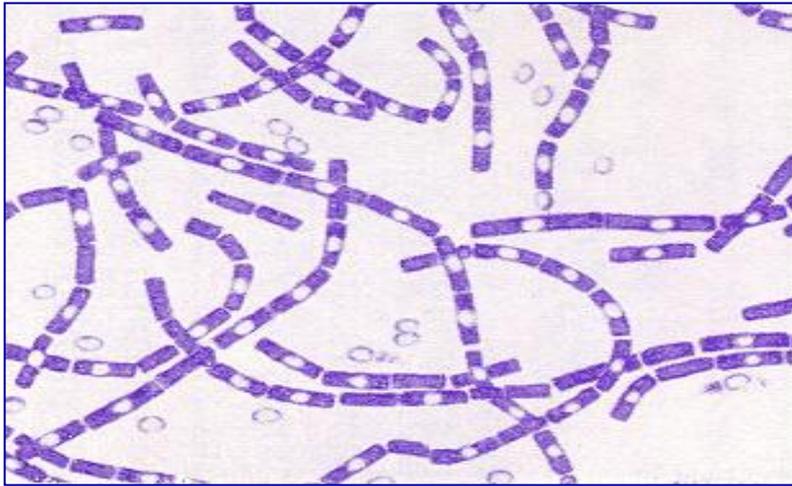
- На стекле делают мазок из исследуемой культуры. Пастеровской пипеткой наносят на культуру одну каплю туши.
- Стеклом с обрезанными краями делают мазок по всему стеклу. Высушивают на воздухе, затем фиксируют в течение 30 минут в фиксирующей жидкости, затем докрашивают фуксином Пффейфера в течение 1 минуты.
- *Микроскопическая картина:* фон - черный, капсула - бесцветная, тело бактерии - красное.



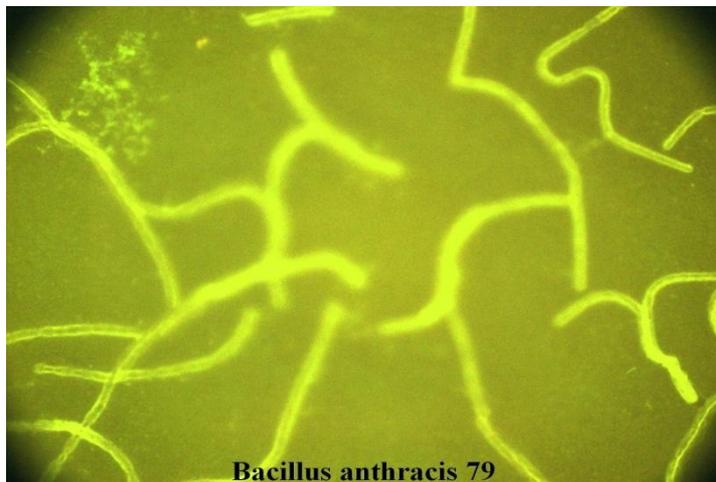
ОКРАСКА КАПСУЛ ПО ГИНС-БУРРИ



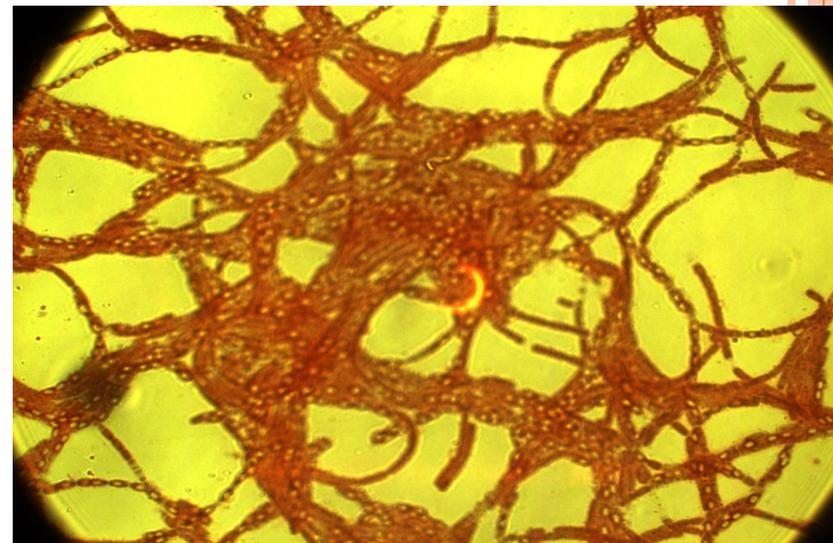
ВОЗБУДИТЕЛЬ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ В МАЗКАХ:



Вегетативные клетки и споры



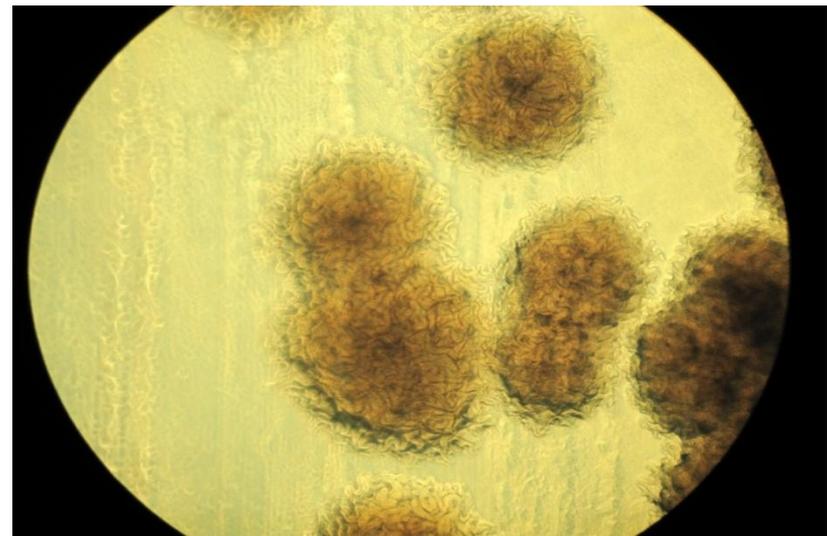
Вегетативные клетки в МФА



Споры возбудителя

ХАРАКТЕР РОСТА НА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

При малом увеличении через 24 часа хорошо выражен рост шероховатых локонообразных колоний с извилистыми краями в виде бахромчатых сплетений "голова медузы" или "львиная грива" (R, RO-формы). Встречаются колонии и без отростков, которые также нужно идентифицировать.

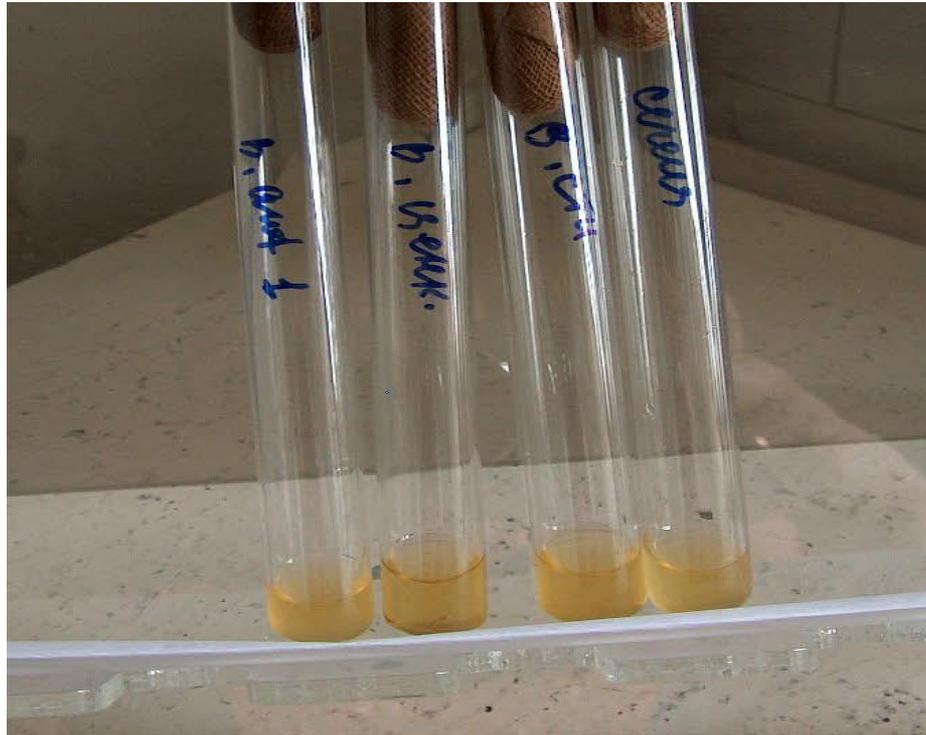


ХАРАКТЕР РОСТА НА ПИТАТЕЛЬНОМ БУЛЬОНЕ

В питательном бульоне микробы сибирской язвы растут в виде беловатого осадка "хлопка" на дне пробирки, бульон при этом остается прозрачным или в нем появляются короткие нити, находящиеся во взвешенном состоянии.



ХАРАКТЕР РОСТА НА ПИТАТЕЛЬНОМ БУЛЬОНЕ

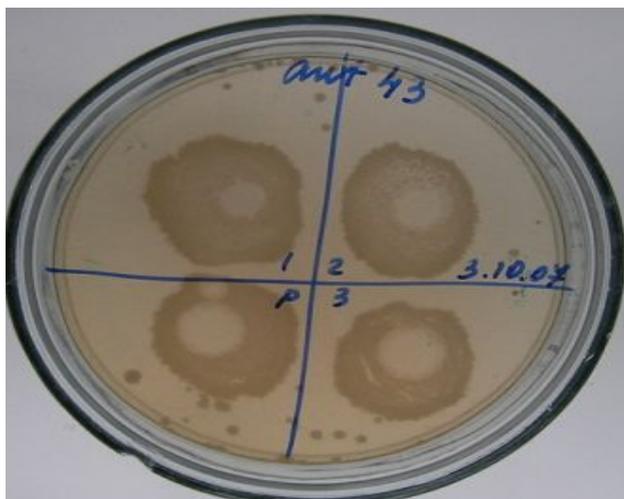


ТЕСТ НА ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К СИБИРЕЯЗВЕННОМУ БАКТЕРИОФАГУ

1. Выращивают испытуемую культуру в бульоне или на агаре Хоттингера в течение 5-6 часов.
2. В чашку Петри с агаром Хоттингера наносят каплю 5-6 часовой исследуемой бульонной культуры.
3. Чашку с приоткрытой крышкой подсушивают в течение 30 минут в термостате, затем в центр подсохшей капли наносят каплю сибиреязвенного бактериофага диаметром 2 мм.
4. Результаты учитывают через 5-6 часов инкубации при температуре 37⁰С под малым увеличением (x8).
5. Окончательный учет производят через 12 - 24 часа невооруженным глазом.
6. В положительных случаях на месте нанесения капли бактериофага отмечается полный или частичный лизис колоний.



ТЕСТ НА ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К СИБИРЕЯЗВЕННОМУ БАКТЕРИОФАГУ



ТЕСТ НА ФОСФАТАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ

- Определяется на питательной среде, приготовленной следующим образом:
- к расплавленному и остуженному до 45°C агара Хоттингера прибавляют 0,001% фенолфталеинфосфата натрия в 10% аммиачном буфере.
- Среду разливают в чашки. После остывания и подсушивания среды на поверхность агара засеивается испытуемая культура.
- Через 18-24 часа инкубации при 37°C на крышку чашки вносят несколько капель аммиака.
- Большинство сибиреязвенных штаммов не способны вырабатывать фосфатазу и, следовательно, разлагать фенолфталеинфосфат натрия.
- Спорообразующие сапрофиты разлагают фенолфталеинфосфат натрия с образованием индикатора фенолфталеина.
- Выросшие на питательной среде колонии сибиреязвенного микроба после добавления аммиака, имеющие щелочную реакцию, остаются бесцветными, а колонии спорообразующих сапрофитов окрашиваются в розовый или красный цвет.



ТЕСТ «ЖЕМЧУЖНОЕ ОЖЕРЕЛЬЕ»

Тест ставится в чашке Петри с 1% кровяным агаром с содержанием пенициллина в конечной концентрации 0,1 ед./мл.

Засеваем бляшками (0,5 см в диаметре) 24 часовые исследуемые культуры .

Учет результатов через 1,5 -2,5 часа.

Приготовление среды

- Во флакон с 1 млн. пенициллина добавляют 10 мл ф.р.=100000 ед./мл (флакон 1).

Титрация:

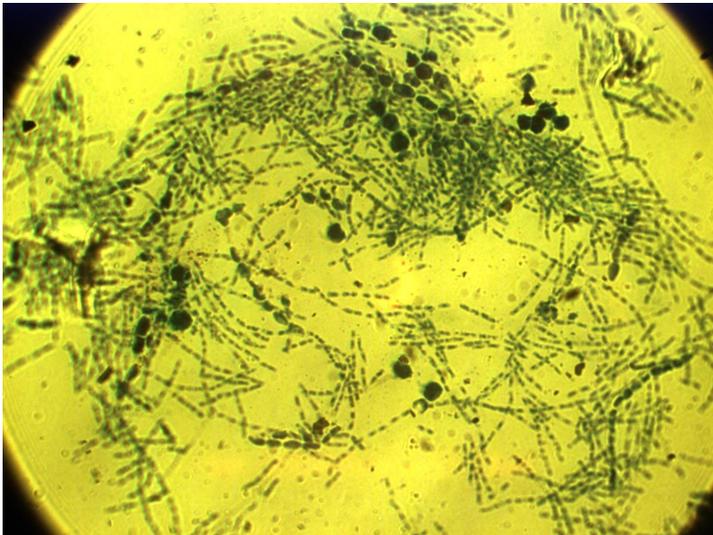
2. Содержимое из флакона 1–1,0 мл вносят в 9 мл ф.р.(флакон 2)= 10000 ед./мл;
3. Содержимое из флакона 2-1,0 мл вносят в 9,0 мл ф.р.(флакон 3)= 1000 ед./мл;
4. Из флакона 3 - 1,0 мл вносят в 9,0 мл ф.р. 9флакон 4) = 100 ед/мл
5. Из флакона 4 - 1,0 мл (100 ед.) добавляют в 100 мл среды (агар Хоттингера) и 1 мл дефибринированной крови.

ТЕСТ «ЖЕМЧУЖНОЕ ОЖЕРЕЛЬЕ»

Модификация

В пробирку с бульоном Хоттингера (рН-7,2-7,4) добавляют стерильно 20% инактивированной лошадиной сыворотки и 0,5 ЕД пенициллина на 1 мл среды.

Среду разливают с соблюдением стерильности в пробирки по 2-3 мл и засевают две капли бульонной или агаровой культуры испытуемого микроба. □



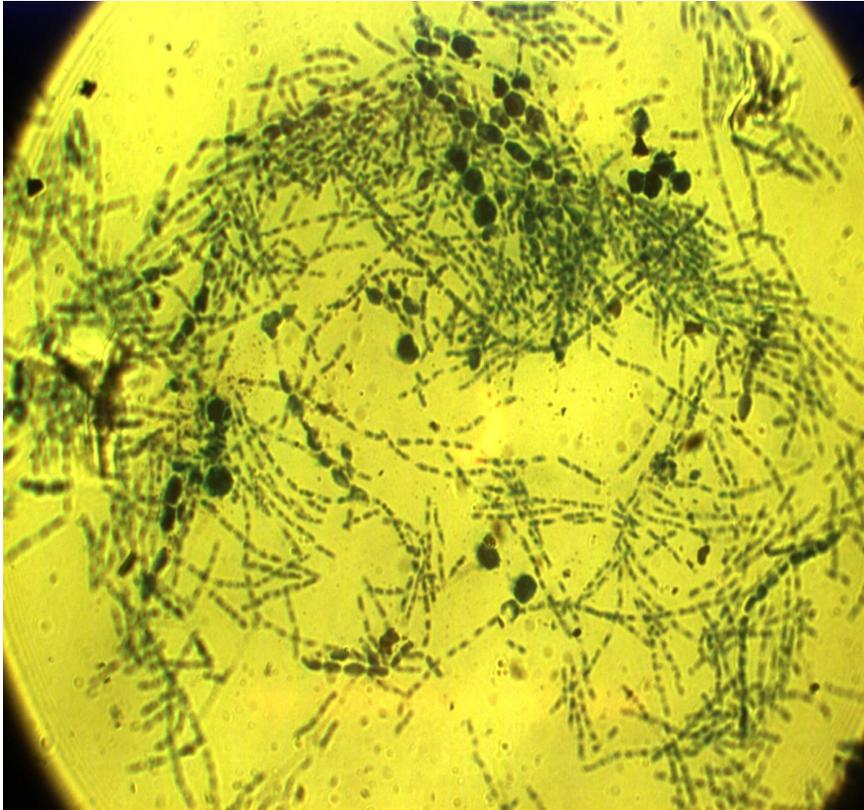
Пробирки с посевами инкубируют в течение 3 часов при температуре 37⁰С, после чего делают мазки на стекле, фиксируют жидкостью Карнуа (6 частей этилового спирта, 3 части хлороформа и 1 часть ледяной уксусной кислоты) до ее испарения, окрашивают метиленовым синим в течение 20-30 секунд и микроскопируют.

Сибиреязвенный микроб в мазках располагается в виде цепочек шарообразной формы, напоминающих ожерелье из жемчуга или бусы.

- Сапрофитные бациллы на среде с пенициллином растут как обычно, в мазках наблюдаются цепочки бацилл.



ТЕСТ «ЖЕМЧУЖНОЕ ОЖЕРЕЛЬЕ»



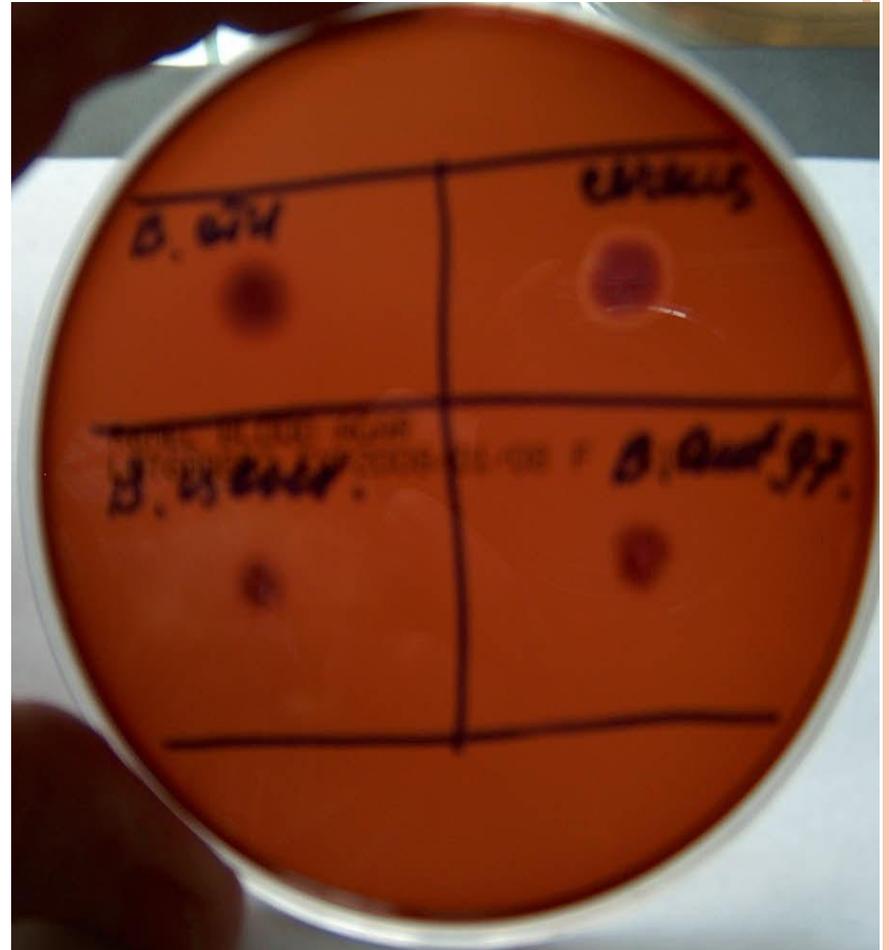
- Во флакон с 1 млн. пенициллина добавляют 10 мл ф.р.=100000 ед./мл (флакон 1).
Титрация:
 2. Содержимое из флакона 1—0,5 мл вносят в 4,5 мл ф.р.(флакон 2)= 10000 ед./мл;
 3. Содержимое из флакона 2-0,5 мл вносят в 4,5 мл ф.р.(флакон 3)= 1000 ед./мл;
 4. Из флакона 3 - 0,5 мл (500 ед.) добавляют в каждую пробирку.

Тест ожерелья — это метод идентификации палочек сибирской язвы основанный на том, что, будучи выращенными на агаре с пенициллином, они распадаются на отдельные шарики, расположенные цепочками.



ГЕМОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

- В агар Хоттингера вносят после остывания до 45°C 5% дефибринированной крови барана. Посев исследуемой культуры проводят бляшками, инкубируют при температуре 37°C в течение 18-20 часов.
- Сибиреязвенный микроб не образует зоны гемолиза (гемолиз-), близкородственный сапрофитные бациллы образует зону просветления вокруг бляшки (гемолиз +).

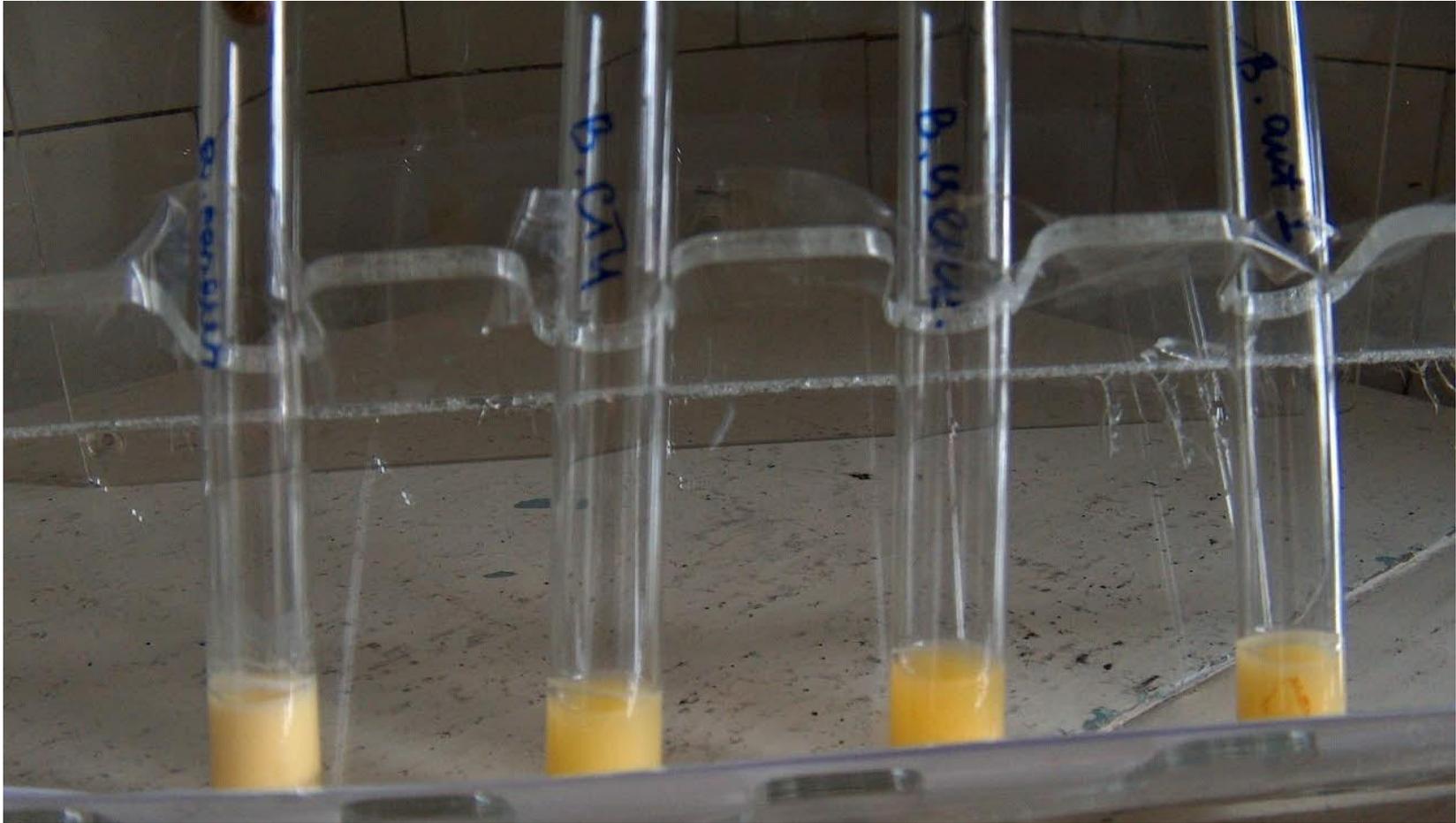


ТЕСТ НА ЛЕТИЦИНАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ

- Определяется при посевах исследуемой культуры в жидкую яичную среду Дрожжевкиной
- а) среду Дрожжевкиной готовят путем смешивания в стерильной посуде одной части куриного желтка, извлеченного стерильно, и двух частей стерильного 0,85% раствора хлорида натрия. В пробирки разливают по 5 мл среды, засевают петлей испытуемую суточную культуру, инкубируют при температуре 37° С в течение 18-24 часов.
- Сибиреязвенный микроб не свертывает желток. Близкородственные сапрофиты свертывает желток.

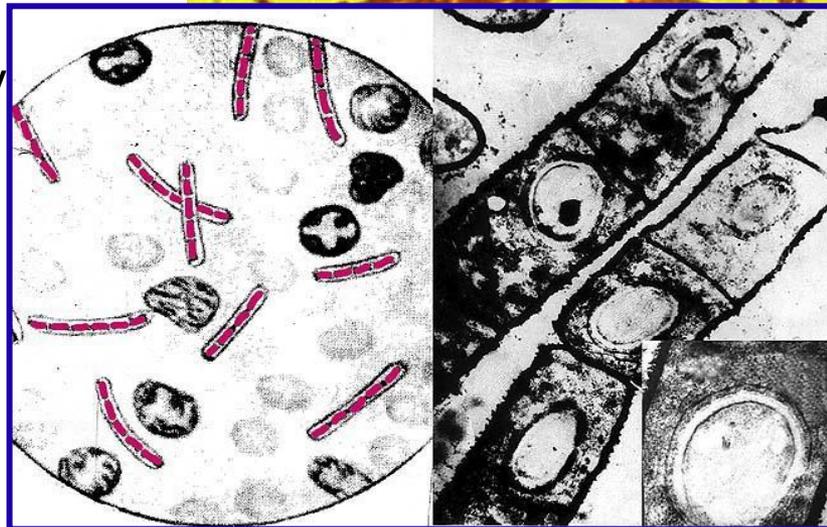
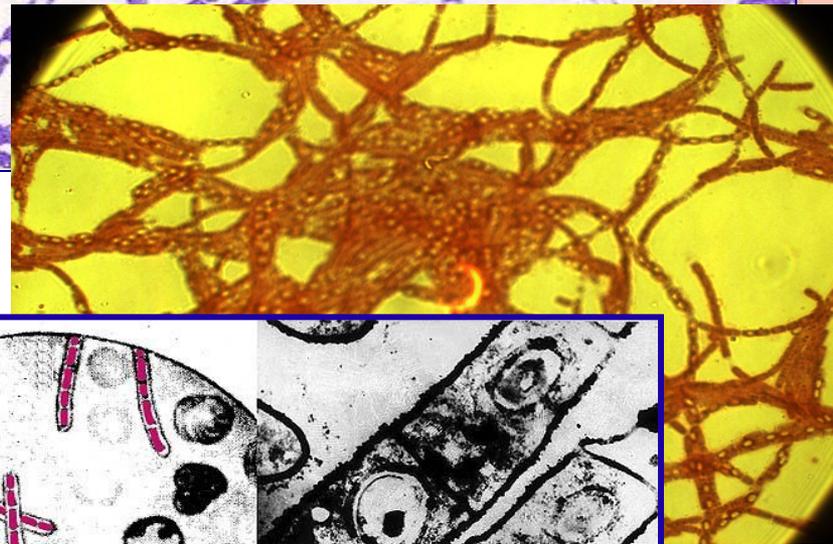
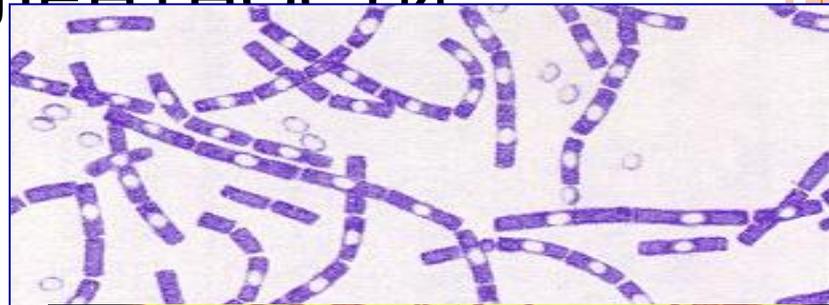


ТЕСТ НА ЛІТИЦИНАЗНУ АКТИВНОСТЬ



ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИРУЛЕНТНОСТИ

- Для заражения животных используют споровую взвесь, которую готовят следующим образом. Культуру отсевают на одну из следующих сред: агар Хоттингера, голодный пшеничный или гороховый агар и выращивают при температуре 34-35⁰С в течение 4-7 суток.
- Процесс спорообразования контролируют просмотром мазков, окрашенных по одному из способов окраски мазков на споры.

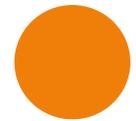
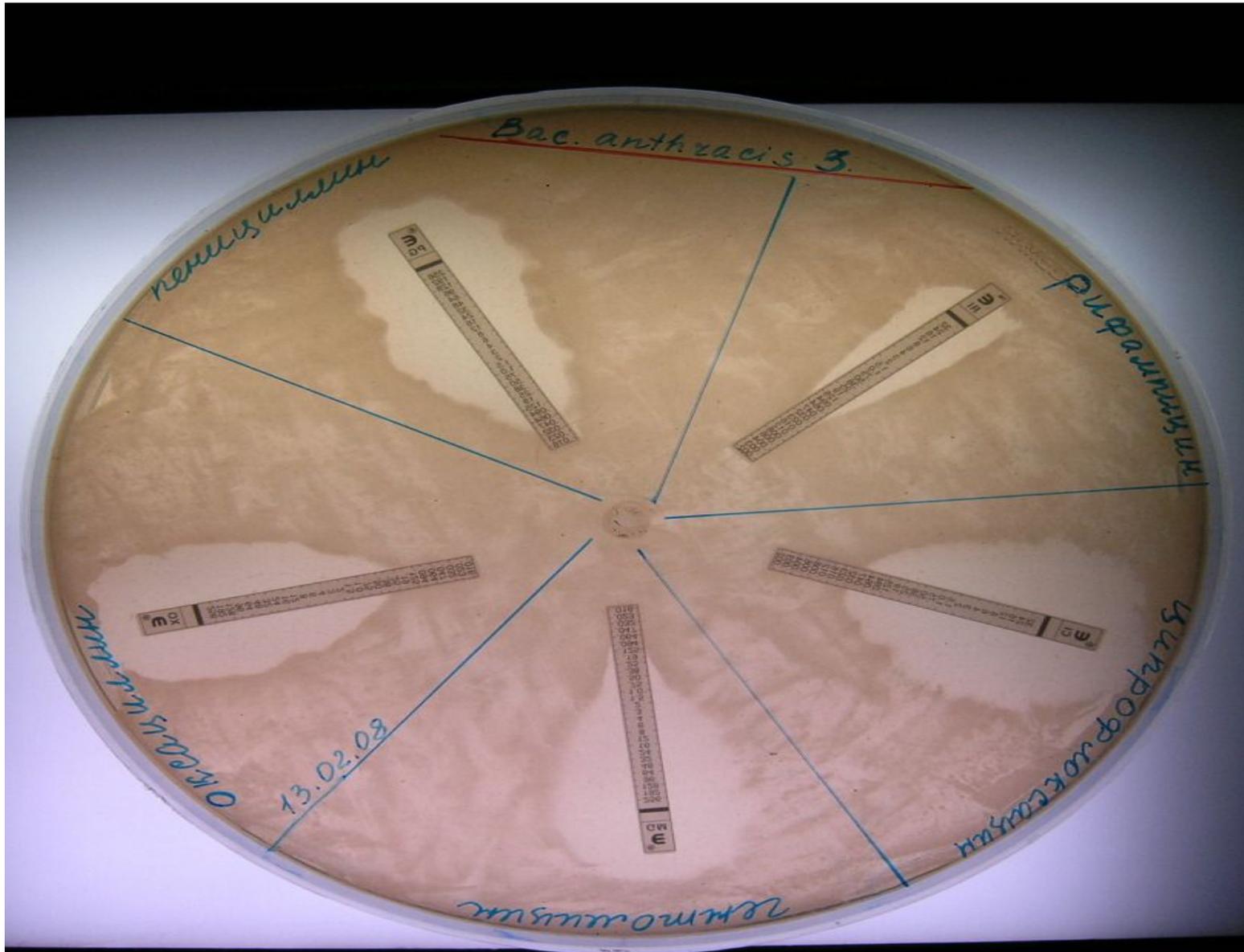


ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИРУЛЕНТНОСТИ

- При наличии в мазке 95-100% спор - культуру смывают дистиллированной водой.
- Для определения LD50 беспородных кроликов.
- С этой целью споровые взвеси, содержащие, 10000, 100000, 1 млн. спор вводят по 1 мл подкожно кроликам (по два кролика на дозу) в область живота и наблюдают за ними в течение 10 дней.
- Наблюдение за животными проводят около 10 суток, отмечая в каждой группе павших от сибиреязвенной инфекции животных.
- Степень вирулентности сибиреязвенного микроба определяют в дозе, вызвавшей гибель кроликов:
- высоко вирулентные штаммы вызывают гибель кроликов при введении им 10 тысяч спор.
- умеренно вирулентные – при введении 100 тысяч - 1 млн спор
- слабовирулентные и авирулентные штаммы не вызывают гибели кроликов в указанных дозах.



ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ



СВОЙСТВА *Bacillus anthracis*

Свойства	Результат	Визуальная оценка	Время, °С
Морфология микроба	Палочка, грам +	По Граму окрашиваются положительно (палочки темно-синие). В молодых и старых культурах иногда встречаются и грамотрицательные клетки.	
Морфология роста на плотных питательных средах	R-форма	Крупные, плоские, сухие, матово-серые шероховатые извилистые колонии, с неровными краями и нежными бахромчатыми сплетениями. Диаметр колоний 3-5 мм.	37° С 18-24 часа
Морфология роста на плотных питательных средах	S-форма	Крупные слизистые, тянущиеся за петлей колонии, состоящие из капсульных клеток.	37° С 18-24 часа (содержанием Углекислоты 5-10%)
Морфология роста в жидких питательных средах	R-форма	На дне пробирки образуется рыхлый белый осадок, надосадочная жидкость остается прозрачной. При встряхивании бульон не мутнеет, осадок разбивается на мелкие хлопья. Ряд штаммов растет в виде нежных отдельных хлопьев, взвешенных в столбике бульона или на 3-4 сутки дают рыхлое пристеночное кольцо по мениску бульона.	37° С 18-24 часа
Морфология роста в жидких питательных средах	S-форма	Обильный хлопьевидный осадок.	37° С 18-24 часа (содержание углекислоты 5-10%)

Свойства	Результат	Визуальная оценка	Время, °С
Подвижность	-	Рост по уколу	37° С, 24 часа
Капсула	+	Для выявления капсулы используют методы окраски по Михину, Гинс-Бурри, Ребигеру, Романовскому-Гимза или Ольту	
Спора	+	Для выявления споры используют окраску по Грамму, Пешкову	25-30° С 3-7 сутки
Гемолитическая активность	+	Отрицательная. Не образует зону гемолиза на агаре с 5% дефибринированной крови	37° С, 24 часа
Лецитиназная активность	-	Отрицательная. Не свертывает яичный желток.	37° С, 24 часа
Фосфатазная активность	+	Отрицательная. Колонии бесцветные. Не изменяют цвет при воздействии на них парами аммиака.	37° С, 24 часа
Феномен «жемчужное ожерелье»	+	В мазках микроб располагается в виде цепочек шарообразной формы.	37° С, 24 часа
Лизис фагом	+	Полный или частичный лизис колоний	37° С, 24 часа

СЕРОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Поиск специфических антител проводят в сыворотках крови людей и животных.

Перед исследованием сыворотки, приготовленной обычным способом, ее предварительно инактивируют мертиолятом натрия (1:10000 в конечной концентрации), затем прогревают при 56⁰С в течение 30 минут и адсорбируют 50% бараными эритроцитами.

- ▣ Методика постановки РНГА макрометод).
 - ▣ В 8 лунок полистироловой пластинки наливают по 0,4 мл разводящей жидкости (твин-80 1:100000). В первую лунку добавляют исследуемый материал и титруют переносом из лунки в лунку по 0,4 мл.
 - ▣ Из последней лунки лишние 0,4 мл выливают (при этом получают двукратные разведения материала).
 - ▣ Затем во все лунки добавляют по капле (0,03-0,05 мл) 2,5% эритроцитарного сибиреязвенного антигенного диагностикума.



УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Положительный результат – полноценная гемагглютинация, когда эритроциты выпадают на дно лунки равномерным слоем в виде зонтика, занимающего не менее $2/3$ дна.

2. ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ РЕЗУЛЬТАТ – ОТСУТСТВИЕ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ, КОГДА ЭРИТРОЦИТЫ ВЫПАДАЮТ НА ДНО ЛУНКИ В ВИДЕ МАЛЕНЬКОЙ ТЕМНО-КОРИЧНЕВОЙ ПУГОВКИ ИЛИ ОЧЕНЬ МАЛЕНЬКОГО КОЛЕЧКА С РОВНЫМ КРАЕМ.



МЕТОДИКА ПОСТАНОВКИ РТНГА (КОНТРОЛЬ СПЕЦИФИЧНОСТИ РНГА).

- РТНГА ставится только параллельно с РНГА.
 - В лунки полистироловой пластинки вносят по 0,2 мл разводящей жидкости (твин-80 1:100000).
 - Затем исследуемую сыворотку титруют переносом из лунки в лунку в объеме 0,2 мл, из последней лунки 0,2 мл разводящей жидкости выливают.
- После чего во все лунки добавляют по 0,2 мл сибиреязвенный антиген (входит в комплект эритроцитарного сибиреязвенного диагностикума) в рабочем разведении.
- Пластинку встряхивают и помещают в термостат при 37°С на 30 минут.
 - Затем во все лунки добавляют по 0,05 мл 2,5% антигенного сибиреязвенного эритроцитарного диагностикума.
 - Пластинку вновь встряхивают и выдерживают при комнатной температуре в течение 2-3 часов, после чего учитывают результат.

УЧЕТ РЕАКЦИИ РТНГА

- 1. Если число лунок с положительной гемагглютинацией в РТНГА уменьшилось или они совсем исчезли по сравнению с РНГА, то результат реакции считается специфичным.
- 2. При отрицательном результате эритроциты в РНГА и в РТНГА выпадают на дно в виде пуговки или узкого колечка с ровными краями.



СЕРОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ (НА АНТИГЕН)

- ▣ *Подготовка материала для исследования.*
 - ▣ Методика подготовки материала для проведения поиска антигена определяется особенностями исследуемого материала.
- ▣ 1. Органы и ткани животных измельчают, добавляют 2% формализированный раствор хлорида натрия в соотношении 1:5. Через два часа инкубации при комнатной температуре прогревают при 56°C 30 минут и эмульсию используют для постановки серологических реакций.
- ▣ Из выращенной КУЛЬТУРЫ СИБИРЕЯЗВЕННОГО МИКРОБА ГОТОВЯТ ВЗВЕСЬ, СООТВЕТСТВУЮЩУЮ 10 ЕД. ПО СТАНДАРТУ МУТНОСТИ. ВЗВЕСЬ ГОТОВЯТ В ФИЗИОЛОГИЧЕСКОМ РАСТВОРЕ, СОДЕРЖАЩЕМ 2% ФОРМАЛИНА, КОТОРЫЙ ОБЕСПЕЧИВАЕТ ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ МАТЕРИАЛА В ТЕЧЕНИЕ 2 ЧАСОВ. ИСХОДНАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ ИССЛЕДУЕМОЙ КУЛЬТУРЫ В РНГА – 10^9 . М. К./ МЛ

РНГА (НА АНТИГЕН)

- В 8 лунок полистироловой пластинки наливают по 0,4 мл разводящей жидкости (твин-80 1:10000). В первую лунку добавляют исследуемый материал в разведении 1:10 и титруют переносом из лунки в лунку по 0,4 мл. Из последней – лишние 0,4 мл выливают (при этом получают двукратные разведения материала). Затем во все лунки добавляют по одной капле (0,03-0,05 мл) эритроцитарного иммуноглобулинового сибирезвенного диагностикума. После его внесения пластинку осторожно встряхивают до полного перемешивания эритроцитов в лунках и оставляют при комнатной температуре. Учет результатов проводят через 3-4 часа.
- Положительный результат – полноценная гемагглютинация, когда эритроциты выпадают на дно лунки равномерным слоем в виде зонтика, занимающего не менее 2/3 дна.
- 2. Отрицательный результат – отсутствие гемагглютинации, когда эритроциты выпадают на дно лунки в виде маленькой темно-коричневой пуговки или очень маленького колечка с ровным краем.



РТНГА

□ В лунки полистироловой пластинки вносят по 0,2 мл разводящей жидкости (твин-80 1: 100000). Затем исследуемый материал титруют переносом из лунки в лунку в объеме 0,2 мл, из последней лунки 0,2 мл удаляют, после чего во все лунки добавляют по 0,2 мл сыворотки агглютинирующей в концентрации 4-8 гемагглютинирующих единиц. Пластинку встряхивают и помещают в термостат при 37°C на 30 минут. Затем во все лунки добавляют по 0,05 мл 2,5% сибиреязвенного иммуноглобулинового эритроцитарного диагностикума. Пластинку вновь встряхивают и через 3-4 часа учитывают результат.

□ ЕСЛИ ЧИСЛО ЛУНОК С ПОЛОЖИТЕЛЬНОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИЕЙ УМЕНЬШИЛОСЬ ИЛИ ОНИ СОВСЕМ ИСЧЕЗЛИ ПО СРАВНЕНИЮ С РНГА, ТО РЕЗУЛЬТАТ РЕАКЦИИ СЧИТАЕТСЯ СПЕЦИФИЧНЫМ.

□ ПРИ ОТРИЦАТЕЛЬНОМ РЕЗУЛЬТАТЕ ЭРИТРОЦИТЫ В РНГА И В РТНГА ВЫПАДАЮТ НА ДНО В ВИДЕ ПУГОВКИ ИЛИ УЗКОГО КОЛЕЧКА С РОВНЫМИ КРАЯМИ.



МФА

1. Для выявления спор и вегетативных клеток сибиреязвенного микроба из исследуемой суспензии делают мазок на предметном стекле ближе к краю стекла.
2. Мазок подсушивают и фиксируют в фиксирующей жидкости. После высыхания препараты окрашивают люминесцирующей споровой сибиреязвенной сывороткой.
3. Фиксированные препараты помещают во влажную камеру (чашки Петри со смоченной водой фильтровальной бумагой) и наносят на них каплю рабочего разведения люминесцирующей сыворотки.
4. Окрашивают в течение 15 минут, затем тщательно промывают водой по 10 минут в разных емкостях, 0,9% раствором хлорида натрия и подсушивают на воздухе.
5. Препараты, приготовленные непосредственно из нативного материала, окрашивают методом контрастирования.
6. С этой целью на мазок наносят смесь люминесцирующей сыворотки и бычьего альбумина, меченого родамином.
7. Смесь этих сывороток готовят в удвоенном рабочем разведении и наносят на мазок. Дальнейшую обработку проводят так же, как и при окраске люминесцирующей сывороткой.



УЧЕТ

□ Перед просмотром на препараты наносят каплю раствора, содержащего 1 часть 0,15М NaCl (РН –7,4) и 9 частей глицерина, накрывают предметным стеклом.

Препараты можно просматривать и без покровного стекла. При работе с иммерсионным объективом необходимо пользоваться иммерсионным маслом. Просмотр проводят при увеличении 6х90, 7х90 и 10х90.

□ Споры и бактерии, окрашенные люминесцирующей сывороткой, дают яркое свечение, имеющее характерную морфологию клетки. Такое свечение называется специфическим в отличие от неспецифического, характеризующегося равномерным свечением всего тела клетки.

□ Положительным результатом считается люминесценция клеток, оцениваемая на четыре и три креста, при наличии 2-5 светящихся клеток в каждом поле зрения.

□ Положительным результатом считается люминесценция клеток, оцениваемая на четыре и три креста, при наличии 2-5 светящихся клеток в каждом поле зрения.



Схема исследования материала на наличие антигена возбудителя сибирской язвы

Реакция преципитации по Асколи

Исследуемый материал	Подготовка материала для исследования.
Ухо, шкура животного, органы, мышцы, загнивший материал	<ol style="list-style-type: none">1. Свежий патологический материал обеззараживают автоклавированием 132° С – 1,5 часа2. Исследуемый материал выдерживают в термостате 37° С – 24ч (можно без выдерживания)3. Экстракция антигена<ol style="list-style-type: none">3.1. Горячий способ: 1-2 г материала заливают 0,9% раствором натрия хлорида в соотношении (1:10). Кипятят на водяной бане 100° С – 40 мин3.2. Холодный способ: 1-2 г материала растирают в ступке с песком, содержимое переносят в колбу, заливают 0,9% раствором натрия (с добавлением 0,3% фенола) хлорида в соотношении (1:10) 20-22° С – 18 часов
Фильтрация материала через асбестовую вату или мелипоровские фильтры (можно через фильтровальную бумагу или центрифугировать.)	

**Реакция
преципитации
по Асколи
(выявление
антигена)**

1. Реакция путем наслаивания.

Компоненты:

1. Преципитирующая сибиреязвенная сыворотка – 0,2-0,3 мл;
2. Исследуемый экстракт – 0,2-0,3 мл.

В уленгутговскую пробирку с 0,2 мл преципитирующей сывороткой наслаивают равное количество экстракта.

2. Реакция путем подслаивания.

Компоненты:

3. Преципитирующая сибиреязвенная сыворотка – 0,2-0,3 мл;
4. исследуемый экстракт – 0,2-0,3 мл.

В уленгутговскую пробирку с 0,2 мл экстракта под него осторожно подслаивают равное количество преципитирующей сыворотки.

3. Контроль.

Компоненты:

1. Преципитирующая сибиреязвенная сыворотка – 0,2-0,3 мл;
2. Сибиреязвенный антиген – 0,2-0,3 мл.

В уленгутговскую пробирку с 0,2 мл преципитирующей сибиреязвенной сыворотки осторожно наслаивают равное количество сибиреязвенного антигена.

4. Учет результата.

Реакцию считают положительной, если через 1-2 минуты и не позже 15 минут на границе между компонентами появляется тонкое беловатое кольцо.





**Реакція
Асколі**



ПОДГОТОВКА ПРОБ К ПОСТАНОВКЕ ПЦР

Подготовка и обезвреживание исследуемого материала

□ Кровь. □

- Исследуемый образец в объеме 0,1 мл засевают в 0,4 мл бульона Хоттингера, пробирку инкубируют при 37°C в течение 2,5 часов.

□ Затем в пробирку вносят 500 ед □ свежеприготовленного раствора пенициллина, инкубируют еще 15 минут;

□ После чего прогревают при 100°C 10 минут.

- 4. Для контроля стерильности делают высевы на агар Хоттингера. □

□ Центрифугируют при 8000 оборотах в течение минуты, надосадок используется для выделения ДНК.

Органы. Кусочки печени, селезенки, легких (5X5) растирают в ступке, добавляют 2-5 мл 0,9% раствора хлорида натрия;

Смывы с поверхностей. Смывы берут с помощью стерильного ватного тампона с 5 мл дистиллированной воды. Центрифугируют при 6000 оборотах 30 минут, осадок ресуспендируют в 0,1 мл воды;

Пробы почвы. Почву 1 г помещают с пробирку с 10 мл дистиллированной воды, перемешивают встряхиванием, дают отстояться. Надосадочную жидкость фильтруют через фильтровальную бумагу, центрифугируют при 6000 оборотах 30 минут. Осадок ресуспендируют в 0,1 мл воды;

Далее:



ПРОДОЛЖЕНИЕ

- 1.** Исследуемый образец в объеме 0,1 мл засевают в 0,4 мл бульона Хоттингера, пробирку инкубируют при 37°C в течение 2,5 часов.
 2. Затем в пробирку вносят 500 ед. свежеприготовленного раствора пенициллина, инкубируют еще 15 минут;
 3. После чего прогревают при 100°C 10 минут.
 4. Для контроля стерильности делали высевы на агар Хоттингера.
- До 5 пункта манипуляции проводят в стеклянных бактериологических пробирках.
- 5.** Центрифугируют при 8000 оборотах в течение минуты, надосадок используется для выделения ДНК. Надосадок переносится в эпиндорфовские пробирки.



РАЗВЕДЕНИЕ ПЕНИЦИЛЛИНА ДЛЯ ПЦР

1. Во флакон с 1 млн. пенициллина добавляют 10 мл ф.р.=100000 ед./мл (флакон 1).

Титрация:

2. Содержимое из флакона 1—0,5 мл вносят в 4,5 мл ф.р.(флакон 2)= 10000 ед./мл;
3. Содержимое из флакона 2—0,5 мл вносят в 4,5 мл ф.р.(флакон 3)= 1000 ед./мл;
4. Из флакона 3 - 0,5 мл (500 ед.) добавляют в каждую пробирку.



ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫЕ ПРИЗНАКИ *BACILLUS ANTHRACIS* И *BACILLUS CEREUS*

№ п/п	Свойства микроорганизмов	Вид возбудителя	
		<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
1	Характер роста (морфология колоний) на питательном агаре.	Крупные, плоские, сухие, матово-серые шероховатые колонии, с неровными краями и бахромчатыми отростками.	Крупные, плоские, сухие, матово-серые шероховатые колонии, с неровными краями и бахромчатыми отростками.
2.	Характер роста на питательном бульоне	Беловатый осадок (хлопок) на дне пробирки или короткие нити, находящиеся во взвешенном состоянии. Бульон не мутнеет.	Бульон мутный, осадка на дне нет.
3.	Морфология микроба в мазках.	Крупная палочка, размером 1,0x1,5 мкм. Палочки в мазке располагаются одиночно, попарно, чаще в виде длинных цепочек с обрубленными краями, свободные края слегка закруглены.	Крупная палочка, размером 1,5x2,5 мкм. Палочки в мазке чаще располагаются одиночно или попарно.
4.	Окраска по Граму	По Граму окрашивается положительно (темно-синие). В молодых и старых культурах встречаются и грамтрицательные палочки.	По Граму окрашивается положительно (темно-синие).
5.	Подвижность.	Неподвижный.	Подвижный.
6.	Спорообразование	Образует споры.	Образует споры.
7.	Капсуло-образование	Образует капсулу.	Не образует капсулу.
8.	Гемолитическая активность	Отрицательная. Не образует зону гемолиза.	Положительная. Образует зону гемолиза.

№ п/п	Свойства микроорганизмов	Вид возбудителя	
		<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
10.	Лецитиназная активность.	Отрицательная. Не свертывает яичный желток.	Положительная. Свертывает желток.
11.	Фосфатазная активность.	Отрицательная. Колонии бесцветные при воздействии на них парами аммиака.	Положительная. Колонии окрашиваются в розовый или красный цвет при воздействии на них парами аммиака.
12.	Пенициллиназная актив-ность. Рост на среде с 10 и 50 ЕД пенициллина	Отрицательная. Не растет на среде с 10 и 50 ЕД пенициллина.	Положительная. Растет на среде с 10 и 50 ЕД пенициллина.
13.	Феномен «жемчужное ожерелье».	В мазках микроб располагается в виде цепочек шарообразной формы.	В мазках микроб располагается в виде цепочек из палочек. Отсут-ствуют. шарообразные формы.
14.	Лизис сибирезвненным бактериофагом	Полный или частичный лизис колоний	Отсутствие лизиса колоний
15.	Рост при 45 ⁰ С	Отсутствует рост	Растет при 45 ⁰ С
16.	Реакция дискпреципитации	Положительная	Отрицательная
17.	РНГА с эритроцитарным иммуноглобулиновым сибирезвненным диагностикумом	Реакция положительная	Реакция отрицательная
18.	Специфическое свечение при обработке сибирезвнен-ной люминесцирующей сывороткой	Яркое специфическое свечение, имеющее характерную морфологию клетки (+++, +++)	Отсутствует специфическое свечение (-)
19.	Патогенность для лабораторных животных	Патогенный	Непатогенный

СХЕМА ИССЛЕДОВАНИЯ МАТЕРИАЛА ОТ БОЛЬНОГО НА СИБИРСКУЮ ЯЗВУ

Методы	Исследуемый материал		Время, ° С
	Кровь 5-10 мл	Мокрота, испражнения, рвотные массы, содержимое везикул, карбункула.	
Экспресс	Мазок по Граму, Михину, Гинс-Бурри, МФА РПГА-РТПГА-РНАТ. ПЦР	Мазок по Граму, Михину, Гинс-Бурри, МФА РПГА- РТПГА-РНАТ. ПЦР	3 часа



Методы	Исследуемый материал		Время, °С
	Кровь 5-10 мл	Мокрота, испражнения и др.	
Ускорен-ный Посев на питательные среды, заражение животных с целью накопления возбудителей.	<p>1. Агар, бульон Хоттингера, агар Хоттингера с 0,001% фенолфталеин фосфата натрия, просмотр через 12-24 часа. МФА, РНГА-РТПГА, ПЦР.</p> <p>Из выросшей культуры:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. «жемчужное ожерелье», 2. капсулообразование. <p>II. Внутривентриально заражают 4 белых мышей, обработанных кортизоном. Вскрывают павших, а выживших через 24, 48 часов (по 2)</p> <p>заражение 4-6 б/м, вскрытие через 20-22 и 40-42 часа – мазки –отпечатки, с окраской по Гинс-Бурри (или др.), МФА, посев органов на питательные среды, РПГА, РТПГА, ПЦР.</p> <p>Тест «Жемчужное ожерелье»</p>	<p>(гретая, негретая пробы – см. схема исследования животного сырья и др.)</p> <p>I. Агар, бульон Хоттингера, агар Хоттингера с 0,001% фенолфталеин фосфата натрия, просмотр через 12-24 часа. МФА, РНГА-РТПГА, ПЦР.</p> <p>Из выросшей культуры:</p> <p>«жемчужное ожерелье», капсулообразование.</p> <p>II. Внутривентриально заражают 4 белых мышей, обработанных кортизоном. Вскрывают павших, а выживших через 24, 48 часов (по 2 б/м) заражение 4-6 б/м, вскрытие через 20-22 и 40-42 часа – мазки – отпечатки, с окраской по Гинс-Бурри (или др.), МФА, посев органов на питательные среды, РПГА, РТПГА, ПЦР</p>	12-24 часа

Методы	Исследуемый материал		Время, °С
	Кровь 5-10 мл	Мокрота, испражнения и др.	

Идентификация выделенной культуры по основным признакам	<ol style="list-style-type: none"> 1. Мазок по Гинс-Бурри (из исходного материала, органов павших биопробных животных или среды с сывороткой); 2. Бульон Хоттингера; 3. Агар Хоттингера; 4. Проба с сибиреязвенным бактериофагом; 5. Тест «жемчужное ожерелье»; 	48-72 часа
Идентификация выделенной культуры по дополнительным признакам	<ol style="list-style-type: none"> 1. Гемолитическая активность; 2. Лецитиназная активность; 3. Фосфатазная активность; 4. Чувствительность к пенициллину; (10 ЕД, 50 ЕД) 5. Подвижность; 6. Протеолитическая активность; 7. Чувствительность к антибиотикам. 	
Патогенность	На лабораторных животных.	До 10 суток