Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы

Методические указания
МУК 4.2.2413—08

gost.e-ecolog.ru

ББК 51.9
Л12
Л12 **Лабораторная** диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. 2009.— 69 с.

1. Разработаны: Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (С. Д. Кривуля, Н. Д. Пакскина); ФГУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (Е. И. Еременко, А. Н. Куличенко, Н. П. Буравцева, О. И. Цыганкова, А. Г. Рязанова, Е. А. Цыганкова, Л. Ю. Аксенова); ФГУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора (Н. А. Осина, И. Н. Шарова, В. Е. Куклев, Е. А. Плотникова, Т. В. Бугоркова); ФГУЗ Иркутский научно-исследовательский институт Сибири и Дальнего Востока Роспотребнадзора (А. В. Родзиковский, З. Ф. Дугаржапова); ФГУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (А. В. Липницкий, А. М. Барков, И. А. Баркова, В. В. Алексеев); ФГУЗ Противочумный центр Роспотребнадзора (В. Е. Безсмертный, С. М. Иванова, В. А. Подледнев); ФГУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора (Л. И. Маринин, И. А. Дятлов, Н. А. Шишкова, А. Н. Мокриевич); ФГУН Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора (Г. А. Шипулин, С. Б. Яцышина); ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии Россельхозакадемии (Ю. О. Селянинов, И. Ю. Егорова).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 3 июля 2008 г. № 2).

3. Утверждены и введены в действие Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 29 июля 2008 г.

4. Введены в действие с 1 сентября 2008 г.

5. С введением в действие данных методических указаний при осуществлении государственного санитарно-эпидемиологического надзора методические указания «Лабораторная диагностика сибирской язвы у животных и людей, обнаружение возбудителя в сырье животного происхождения и объектах внешней среды», утвержденные 01.09.86 начальником Главного управления ветеринарии Госагропромкомитета СССР и начальником Главного управления карантинных инфекций Минздрава СССР, применению не подлежат.

ББК 51.9

© **Роспотребнадзор, 2009**
© **Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009**

Содержание

1. Область применения 4
2. Нормативные и методические ссылки 5
3. Общие положения 6
4. Материал для исследования, взятие, пересылка материала и подготовка проб для исследования 10
5. Порядок проведения исследования 19
6. Выдача заключений по результатам лабораторного исследования на сибирскую язву 44
7. Режим работы в лабораториях, работающих с возбудителем сибирской язвы 46

Приложение 1. Питательные среды, применяемые для выделения и идентификации возбудителя сибирской язвы 47

Приложение 2. Приготовление рабочих растворов и реагентов 50

Приложение 3. Критерии интерпретации результатов исследования *B. anthracis*: пограничные значения диаметров зон подавления роста (мм) и величин МПК (мг/л) антибактериальных препаратов 53

Приложение 4. Отличительные признаки штаммов сибиреязвенного микроба различных типов 54

Приложение 5. Диагностические препараты, применяемые для индикации и идентификации возбудителя сибирской язвы 56

Приложение 6. Устойчивость *B. anthracis* к физическим и химическим факторам 58

Приложение 7. Иллюстрации к методическим указаниям «Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы» 60

Приложение 8. Временной график выполнения лабораторных исследований на сибирскую язву 66

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный врач
Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
29 июля 2008 г.
Дата введения: 1 сентября 2008 г.

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ
И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы

Методические указания
МУК 4.2.2413—08

1. Область применения

1.1. Настоящие методические указания предназначены для специалистов органов и учреждений Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, а также могут быть использованы специалистами других заинтересованных организаций.

1.2. В методических указаниях определены порядок забора, хранения, транспортирования и выполнения лабораторных исследований биологического материала от больных и умерших людей, животных с подозрением на сибирскую язву, а также материала из объектов окружающей среды, подозрительного на контаминацию возбудителем данного заболевания.

Список сокращений

ВНИИВВиМ – Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии;
ГИСК – Государственный институт стандартизации и контроля;
ГКИ – Государственный контрольный институт;
ДДМ – диско-диффузионный метод;
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

ИФА – иммуноферментный анализ;
кДа – килодальтон;
ЛФ – летальный фактор;
МПА – мясопептонный агар;
МПБ – мясопептонный бульон;
МПК – минимальная подавляющая концентрация;
МФА – метод флуоресцирующих антител;
ОФ – отечный фактор;
ПА – протективный антиген;
ПЦР – полимеразная цепная реакция;
РНГА – реакция непрямой гемагглютинации;
РТНГА – реакция торможения непрямой гемагглютинации;
«СОПЭК» – среда для сочетанного определения продукции экзотоксина и капсулы;
ЭДТА – этилендиаминтетраацетата динатриевая соль;
DCL – абсолютная летальная доза;
LD_{50} – половинная летальная доза;
MLVA – метод анализа областей генома с вариабельным числом тандемных повторов.

2. Нормативные и методические ссылки

2.1. Санитарно-эпидемиологические правила «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности). СП 1.3.1285—03».

2.2. Санитарные правила «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I—IV групп патогенности. СП 1.2.036—95».

2.3. «Сибирская язва. СП 3.1.089—96, ВП 13.3.1320—96».

2.4. Практическое руководство «Специфическая индикация патогенных биологических агентов», 2006.

2.5. Методические указания «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I—II групп патогенности. МУ 1.3.1794—03».

2.6. Методические указания «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. МУК 4.2.1890—04».

2.7. Методические указания «Обеззараживание биологического материала и объектов внешней среды, зараженных бактериями I—IV групп патогенности, при исследованиях методом ПЦР. МУ 3.5.5.1034—01».

2.8. Методические рекомендации по использованию этилового спирта с 3 % перекиси водорода для фиксации на предметном стекле возбудителя сибирской язвы, 1984 .

2.9. Методические рекомендации по отбору проб почвы для бактериологического исследования на наличие возбудителей сибирской язвы и актиномицетов-антагонистов, 1984.

2.10. Методические рекомендации «Использование 0,05—0,1 % раствора Твина-80, как разводящей жидкости, для определения концентрации спор сибиреязвенного микроба», 1986.

2.11. Методические рекомендации «Определение гемолитической активности у сибиреязвенного микроба», 1989.

2.12. Методические рекомендации по проведению работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции. Основные положения, Госкомсанэпиднадзор РФ, 1995.

2.13. Методические рекомендации «Забор, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики». МЗ РФ, ЦНИИЭ, 2004.

2.14. Методические рекомендации «Взаимодействие органов управления, учреждений и специализированных формирований при ликвидации последствий террористических актов с применением патогенных биологических агентов и опасных химических веществ. МР 0100/0556-04-34», 2005.

2.15. Инструкция по определению чувствительности возбудителей опасных инфекционных заболеваний к антибиотикам и химиопрепаратам, 1990.

3. Общие положения

Сибирская язва (Anthrax) – это острое инфекционное заболевание животных и человека, относящееся к группе особо опасных инфекций. Основным источником инфекции для человека при сибирской язве являются больные травоядные животные. Они в течение всего периода болезни выделяют возбудитель с мочой, испражнениями и слюной в почву, которая становится его дополнительным резервуаром. Заражение животных происходит главным образом алиментарным (через корм и питьевую воду, инфицированные спорами), реже – трансмиссивным (через укусы кровососущих насекомых) и воздушным путями.

В подавляющем большинстве случаев человек заражается сибирской язвой при разделке туш вынужденно убитого скота; употреблении в пищу полученных от него мяса или мясных продуктов; непосредственном контакте с трупами погибших животных, шерстью, шкурами, кожей, щетиной, зараженными возбудителем; уходе за больными животными. Возможно также заражение через укусы кровососущих насекомых, контаминированную почву и при вдыхании содержащего споры аэрозоля.

В зависимости от путей заражения у человека развивается кожная или висцеральная (кишечная, легочная) формы сибирской язвы. Любая из этих форм может приводить к развитию сепсиса и осложняться сибиреязвенным менингитом (генерализованная форма).

Возбудитель этой инфекции в 2001 г. в США был использован как средство биологического терроризма, что привело к человеческим жертвам и возникновению паники среди населения. Поэтому своевременная и точная лабораторная диагностика сибирской язвы приобретает сейчас особое значение.

Диагностика сибирской язвы у человека и животных основывается на эпизоотологических, эпидемиологических, клинических, лабораторных и патологоанатомических данных. Лабораторные исследования направлены на обнаружение и идентификацию возбудителя сибирской язвы, выявление специфических антител и аллергической перестройки в организме больных людей.

3.1. Краткие сведения о возбудителе сибирской язвы

Возбудитель сибирской язвы – B. anthracis, относится к семейству спорообразующих микроорганизмов Bacillaceae, роду Bacillus. В роду Bacillus, насчитывающем 101 вид, выделяют группу видов Bacillus cereus, в которую входят близкородственные B. cereus, B. anthracis, B. thuringiensis, B. mycoides и недавно признанный новым видом психротолерантный микроб B. weichenstephanensis.

Морфология B. anthracis. В зависимости от стадии развития культуры, а также условий окружающей среды, возбудитель сибирской язвы может существовать в трех формах – в виде бескапсульных вегетативных палочек (бацилл), инкапсулированных палочек и спор.

В мазках из культур, выросших на питательных средах, палочки (размеры 1—1,5 × 6—8—10 мкм) расположены длинными цепочками, концы микробов в окрашенных препаратах обрублены и цепочка напоминает бамбуковую трость с коленчатыми сочленениями (прилож. 7, рис. 1). В мазках из патологического материала палочки расположены поодиночке, попарно или короткими цепочками, окружены хорошо выраженной капсулой, зачастую общей для группы микробов (прилож. 7, рис. 2).

Спорообразование. При выращивании возбудителя на питательных средах и в условиях окружающей среды, при свободном доступе кислорода воздуха, определенной влажности и температуре от 12,0 до 42,5 °С образуются споры овальной формы размером 0,8—1 × 1,2—1,5 мкм. В каждой вегетативной клетке (спорангии) образуется только одна спора, располагающаяся центрально, ее

диаметр не превышает ширину тела микробной палочки (прилож. 7, рис. 3).

Процесс спорообразования состоит из четырех основных стадий: подготовительной, образования проспор, готовых спор и зрелых спор. Спорогенез зависит от особенностей штамма, наличия тех или иных питательных веществ, pH среды, температуры выращивания, влажности и др.

При попадании спор в благоприятные условия (влажность, аэрация, температура, наличие необходимых питательных веществ) из них быстро образуются вегетативные клетки. Время прорастания спор может составлять несколько часов и зависит от температуры (оптимум – 37 °С) и других факторов.

Культурально-биохимические свойства. Сибиреязвенный микроб – факультативный анаэроб, оптимальная температура роста 34—37 °С, оптимальное значение pH 7,2—7,8, неподвижный, хорошо растет на обычных питательных средах – МПБ и МПА. Характер роста в совокупности с другими признаками учитывается при идентификации.

При посевах на чашки Петри с питательным агаром после суточной инкубации при (36 ± 1) °С микроб формирует крупные шероховатые сухие матовые колонии в R-форме, с «шагреневой» поверхностью, с неровными краями и отходящими от них волнистыми отростками. При малом увеличении под микроскопом (7 × 10) они напоминают локоны волос или львиную гриву (прилож. 7, рис. 4).

Характерный придонный рост сибиреязвенного микроба в МПБ или 1 %-й пептонной воде похож на комочек ваты, с трудом разбивающийся при встряхивании, при этом бульон остается прозрачным (прилож. 7, рис. 5).

Сибиреязвенный микроб способен разлагать с образованием кислоты без газа глюкозу, мальтозу, сахарозу и некоторые другие сахара, но не разлагает лактозу. Обладает относительно низкой протеолитической активностью и при посеве уколом в столбик 10—12 %-го мясопептонного желатина и выращивании при 22 °С рост микроба напоминает елочку, опрокинутую верхушкой вниз; на 3—5 день желатин разжижается в виде воронки. Большинство сапрофитов полностью разжижает желатин в более короткие сроки. При росте на кровяном агаре с 3—5 % дефибринированной крови барана через 20—24 ч гемолиз не наблюдается, в то время как многие сапрофиты дают быстрый гемолиз (через 12—18 ч при 37 °С). Большинство штаммов сибиреязвенного микроба не образует фермент лецитиназу. При росте на агаре с куриным желтком вокруг колоний не происходит помутнения среды в виде беловатой зоны, а при посеве на жидкую желточную среду желток не сверты-

вается даже при 5—6-суточном инкубировании. Сапрофиты свертывают желток в течение 6—10 ч. Сибиреязвенный микроб, в отличие от сапрофитных бацилл, обладает низкой фосфатазной активностью и не способен разлагать фосфаты, добавляемые в питательную среду (тест на фосфатазу).

Большинство штаммов сибиреязвенного микроба чувствительны к пенициллину и при выращивании на МПА или МПБ в присутствии 0,5—0,05 ЕД/мл бензилпенициллина через 3 ч инкубирования образуют цепочки из шарообразных клеток – «жемчужное ожерелье» (прилож. 7, рис. 6).

До 95 % штаммов сибиреязвенного микроба лизируется сибиреязвенными бактериофагами «Гамма», «К» и Fah-ВНИИВВиМ (прилож. 7, рис. 7).

Чувствительность к антибиотикам. Возбудитель сибирской язвы чувствителен к большинству антибиотиков – цефалоспоринам I поколения, тетрациклинам, рифампицинам, аминогликозидам и фторхинолонам. Пенициллин способен задерживать развитие сибиреязвенного микроба даже при низкой концентрации в питательной среде. К некоторым макролидам сибиреязвенный микроб умеренно устойчив, а к цефалоспоринам II—IV поколения устойчив.

Факторы вирулентности (агрессии). Возбудитель сибирской язвы обладает почти универсальной патогенностью для млекопитающих – человека и других приматов, сельскохозяйственных и диких животных, лабораторных животных.

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

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

Типичные вирулентные штаммы B. anthracis образуют капсулу в организме больных людей и животных, а также при культивировании на 1 %-м бикарбонатно-сывороточном агаре в атмосфере, содержащей 5—50 % углекислоты или на жидкой среде ГКИ, содержащей 40 % инактивированной бычьей (лошадиной) сыворотки и 60 % раствора Хенкса. На 1 %-м бикарбонатном агаре микроб растет в SM-форме в виде гладких, блестящих, влажных, слизистых колоний с неровными краями (прилож. 7, рис. 8).

Экзотоксин играет ведущую роль в патогенезе сибиреязвенной инфекции и формировании специфического иммунитета. Сибиреязвенный экзотоксин относится к бинарным двухкомпонентным белковым токсинам АВ-типа и обладает двумя разными биологическими активностями. Компонентами токсина являются ОФ, ПА

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

Геном типичных штаммов сибиреязвенного микроба представлен одной кольцевой хромосомой и двумя плазмидами. Токсинообразование и капсулообразование детерминированы плазмидами pXO1 и pXO2. Отсутствие хотя бы одной из этих плазмид приводит к снижению вирулентности вплоть до полной ее утраты.

В природе, наряду с «классическими» диплазмидными штаммами, с меньшей частотой встречаются атипичные моно- и бесплазмидные варианты возбудителя.

3.2. Исследование на сибирскую язву

Исследование на сибирскую язву включает микроскопию мазков из исходного материала, высевы на питательные среды, постановку основных и дополнительных тестов идентификации, использование МФА для обнаружения антигенов и антител к ним, постановку ПЦР, биопробы и реакции преципитации. У человека и свиней, в случае невозможности установить диагноз вышеперечисленными методами, обязательна постановка клинической кожно-аллергической пробы с сибиреязвенным аллергеном.

4. Материал для исследования, взятие, пересылка материала и подготовка проб для исследования

Все работы по забору, транспортированию и подготовке проб клинического и секционного материала от людей и животных, из объектов окружающей среды осуществляют в строгом соответствии с требованиями СП 1.3.1285—03 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)», СП 1.2.036—95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I—IV групп патогенности, МУ 1.3.1794—03 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I—II групп патогенности».

4.1. Материал для исследования:

а) от больных или подозрительных на заболевание людей, в зависимости от формы заболевания – содержимое везикул, отделяемое карбункула или язвы, струпья, мокрота, кровь, спинномозговая жидкость, моча, испражнения, экссудаты;

б) трупный материал – кровь, экссудаты, кусочки органов (селезенки, печени, лимфоузлов и др.);

в) материал от животных;

г) продовольственное сырье и продукты животного происхождения;

д) объекты окружающей среды – почва, трава, фураж, подстилка, вода и т. д.

Забор всех видов материала осуществляется в стерильную стеклянную или пластиковую посуду, соответствующую объему проб. Иммунофлуоресцентным, серологическим и бактериологическим методами исследуется соответствующий материал из общей пробы.

4.2. Взятие материала от животных

4.2.1. Для бактериологического исследования

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 у основания в двух местах и отрезают между лигатурами. Место отреза уха на трупе прижигают. Отрезанное ухо заворачивают в пергаментную бумагу, смоченную в дезинфицирующем растворе. 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 (селезенки, печени, лимфоузлов, в которых имеются характерные патологоанатомические изменения), костный мозг (из грудины или канала бедренной кости). Материалы от трупа необходимо брать и исследовать как можно раньше, так как из-за развития посторонней микрофлоры трудно выделить чистую культуру возбудителя сибирской язвы. От трупов свиней в обязательном порядке отбирают заглоточные 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.

4.2.2. Для исследования методом ПЦР

Микробиоптат/микроаутоптат (пунктат) помещают в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5—1,7 мл с завинчивающимися или защелкивающимися крышками, содержащие 0,1—0,2 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида или транспортной среды № 1 (прилож. 1.8).

Макробиоптат/макроаутоптат (кусочки тканей массой 0,1—1,0 г) помещают в контейнер с 0,9 %-м раствором натрия хлорида или транспортной средой № 2 (прилож. 1.9).

4.3. Взятие материала от человека

4.3.1. Для бактериологического исследования

Забор материала от больных людей должен производиться до начала специфического лечения.

Необходимо осторожно обработать спиртом кожу вокруг пораженного места и поверхность карбункула. Содержимое везикулы отсасывают стерильным шприцем или стерильной тонко оттянутой обломанной пастеровской пипеткой. В пипетку обычно набирается небольшое количество опалесцирующей желтоватой жидкости в объеме, достаточном для посева на агаровую среду и для приготовления мазка. Затем иглу или кончик пипетки помещают в пробирку с питательным бульоном. Отделяемое язвы снимают с поверхности стерильным тампоном, смоченным 0,9 %-м раствором натрия хлорида. Фрагменты отторгнутого струпа снимают влажным тампоном или пинцетом.

При всех формах заболевания из крови, взятой на анализ, возбудитель сибирской язвы можно выделить уже при первом повышении температуры тела. Кровь берут из локтевой вены стерильным шприцем в объеме 3—5 мл (с учетом необходимости проведения бактериологических, серологических исследований и ПЦР). Сразу же, непосредственно у постели больного, по 0,1—0,2 мл крови засевают на питательные среды (агар и бульон Хоттингера, pH 7,2—7,5). Одновременно на предметных стеклах делают 2—3 тонких мазка, а остатки крови оставляют для получения сыворотки. Если невозможно сразу же исследовать кровь, ее из шприца переносят в стеклянную посуду (бактериологические пробирки).

Мокроту и испражнения собирают в стерильную посуду. Для высева на питательные среды отбирают слизь с примесью крови.

При висцеральных формах сибирской язвы и менингите исследуют спинномозговую жидкость, которую отбирают после пункции поясничной, субокципитальной области или мозговых желудочков в количестве 0,5 мл в стерильную микроцентрифужную пробирку объемом 1,5—1,7 мл с завинчивающейся или защелкивающейся крышкой. При подозрении на ингаляционное заражение исследуют также мазки из полости носа. Их берут сухими стерильными ватными тампонами на зондах. Тампон вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2—3 см до нижней раковины. Затем тампон слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю раковину, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа. После забора материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в стерильную микроцентрифужную пробирку объемом

1,5—1,7 мл с завинчивающейся или защелкивающейся крышкой с 0,9 %-м раствором натрия хлорида. Погрузив рабочую часть зонда в раствор натрия хлорида, вращают зонд в течение 10—15 с, избегая разбрызгивания раствора. Вынимают зонд из раствора, прижимая его к стенке пробирки, и, отжав избыток жидкости, удаляют зонд и закрывают пробирку.

4.3.2. Для исследования методом ПЦР

Забор крови проводят из локтевой вены в объеме 3—5 мл. Кровь аккуратно (без образования пены) переносят в стерильную пробирку, содержащую 6 %-й раствор ЭДТА в отношении 1 : 20 к объему крови. Используют одноразовые шприцы, иглы и посуду.

Содержимое везикул, карбункулов в объеме 0,1—0,3 мл и фрагменты струпьев массой 10—100 мг помещают в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5—1,7 мл с завинчивающимися или защелкивающимися крышками, содержащие 0,1—0,2 мл транспортной среды № 1 (прилож. 1.8). Спинномозговую жидкость после пункции одноразовой пункционной иглой отбирают в количестве 0,5 мл в стерильную микроцентрифужную пробирку объемом 1,5—1,7 мл с завинчивающейся или защелкивающейся крышкой.

Мазки из полости носа берут сухими стерильными ватными тампонами на зондах, как и для бактериологического исследования, с той разницей, что тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5—1,7 мл с завинчивающейся или защелкивающейся крышкой с транспортной средой № 2 (прилож. 1.9).

Транспортирование биологического материала для исследования методом ПЦР при отсутствии транспортной среды осуществляют в специальном термоконтейнере с охлаждающими элементами или в термосе со льдом при температуре 2—8 °С. Недопустимо замораживание образцов цельной крови!

4.4. Взятие материала из сырья животного происхождения и объектов окружающей среды

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

4.4.1. Для бактериологического исследования

4.4.1.1. Мясо и мясные продукты

Из материала, доставленного на исследование, отбирают образцы весом 10—30 г, из мяса – участки с лимфоидной тканью или кровоизлияниями.

4.4.1.2. Шерсть

Шерсть для исследования отбирают из разных мест, не менее 5 образцов массой около 2 г каждый (лучше 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.

4.4.1.3. Кожа и кожсырье

Берут кусочки кожи размером 3 × 3 см с периферических незагнивших и незаплесневевших участков шкурок. При наличии на внутренней стороне шкурки кровоподтеков или инфильтратов пробы берут и в этих местах.

4.4.1.4. Почва

При отборе проб почвы следует руководствоваться «Методическими рекомендациями по отбору проб почвы для бактериологического исследования на наличие возбудителей сибирской язвы и актиномицетов-антагонистов» (М.,1984). Пробы почвы с мест вероятного обсеменения спорами возбудителя (мест вынужденного убоя скота, стоянок и водопоя животных) берут на глубине до 15 см, на территории скотомогильников – 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 5 точек по диагонали или 4 точки по краям и одну посередине, откуда производят отбор проб почвенным буром. Перед взятием почвы на территории скотомогильника верхний ее слой снимают на 2—3 см и пробы берут на глубину до 1,5—2,0 м через каждые 25 см не менее 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 мешочки или в плотно закрытую посуду, так как в этих условиях происходит бурное развитие актиномицетов, губительно действующих на возбудитель сибирской язвы. 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.

4.4.1.5. 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 бутыли. 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.

4.4.1.6. 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 см^2. Затем тампоны помещают в пробирки, заливают стерильной дистиллированной водой (15 мл) и закрывают пробкой.

4.4.1.7. Корма

Концентрированные корма (зерно, отруби, комбикорм) отбирают в зависимости от условий хранения. При наличии незатаренных кормов первичные пробы отбирают из расчета 1 проба не менее 400 г на 4 м^2 поверхности, но не менее 5 проб от каждого закрома, партии. Первичные пробы берут как из поверхностных, так и из глубоких слоев корма равномерно по всей площади. При наличии затаренных кормов отбор проводят от каждой упаковочной единицы. Отбор проб проводят сухим стерильным пробным щупом. После взятия проб от каждого объекта (партии) щуп очищают и обжигают огнем паяльной лампы. Пробы грубых кормов (сено, солома) берут из разных мест скирды при помощи ножниц и пинцета из расчета 1 проба (40 г) на 4 м^2 площади скирды. Зеленую массу отбирают, как грубые корма. Корнеплоды, в зависимости от величины, отбирают из расчета 1—3 штуки на 4 м^2 площади бурта, отсека. С отобранных корнеплодов скальпелем в местах, где имеются остатки земли, срезают поверхностный слой, который используют для исследования.

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.

4.4.1.8. Воздух

Пробы воздуха отбирают с помощью специальных приборов, снаряженных сорбирующей жидкостью или фильтрами. Объем исследуемого воздуха должен составлять не менее 3—5 м³.

4.4.2. Для исследования методом ПЦР

Для исследования методом ПЦР отбирают пробы из объектов окружающей среды, пищевых продуктов (мясо и продукты животного происхождения), сухих и сочных кормов, подстилки, шкур, шерсти, почвы, воды, смывов с поверхностей. Отбор проб осуществляют так же, как и для бактериологических исследований.

4.5. Направление материала на исследование

Транспортирование и хранение биологического материала для исследования методом ПЦР должны осуществляться с соблюдением «холодовой цепи»: образцы цельной крови – при температуре 2—8 °С – в течение 1 сут; образцы плазмы и сыворотки крови – при температуре 2—8 °С – в течение 5 сут, при температуре –70 °С – длительно.

Образцы остальных видов биологических материалов – при температуре 2—8 °С – в течение 1 сут, при температуре –20 °С – в течение 1 недели, при температуре –70 °С – длительно. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

Патологический материал для исследования помещают в стерильную посуду (пробирки, банки или другую лабораторную посуду). Высушенные на воздухе мазки кладут в стерильные чашки Петри, которые обертывают плотной бумагой с надписью «мазок не фиксирован». В направлении к материалу от больного человека или трупа указывают фамилию, имя, отчество больного (умершего), место и время взятия материала, его наименование и предположительный диагноз. Пробы почвы, кормов и других сыпучих объектов помещают в сухую стеклянную банку и закрывают стерильной крышкой, пробкой или пергаментом, можно использовать полиэтиленовые мешочки (кроме проб почвы), которые завязывают шпагатом. Пробы воды наливают в стерильные стеклянные бутылки и закрывают стерильными резиновыми пробками. Допускается использование одноразовых стерильных или многоразовых автоклавируемых пластиковых флаконов. Все пробы нумеруют, емкости заворачивают в лигнин или гигроскопическую вату в количестве, достаточном для сорбции всей жидкости в случае повреждения упаковки. Пробы упаковывают во влагонепроницаемую тару, которую обвязывают, пломбируют или опечатывают, делают надпись «верх, осторожно». Пробы материала и сопроводительные документы доставляются нарочным на спецтранспорте.

В сопроводительной к пробам 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. К сопроводительной прилагают опись с указанием места отбора каждой пробы.

4.6. Подготовка проб к бактериологическому исследованию

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 колбочку.

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 (№ 3) или осадить центрифугированием при 6 000 об./мин в течение 15 мин. 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 ресуспендируют в 1—2 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида. Полученную микробную взвесь используют для исследования. Отфильтрованную воду обеззараживают добавлением сухой хлорной извести из расчета 200 г на 1 л.

Тампоны, которыми делают смывы с объектов окружающей среды, отжимают о стенки пробирки и удаляют, а оставшуюся жидкость исследуют.

Пробы почвы освобождают от корней, камешков и тщательно перемешивают. От каждой пробы берут 90—100 г почвы, помещают в колбу, заливают стерильным 0,9 %-м раствором натрия хлорида или 0,5 % пирофосфата натрия из расчета получения 15—20 мл суспензии. Колбу закрывают, тщательно встряхивают в течение 5—10 мин, дают отстояться 3—5 мин и надосадочную жидкость переносят в пробирку для исследования.

Для повышения эффективности выявления спор B. anthracis целесообразно проводить двукратную обработку образцов почвы диспергирующей жидкостью с 0,5 % пирофосфата натрия. Для этого навеску почвы помещают в стерильный стеклянный или пластиковый флакон и заливают диспергирующей жидкостью из расчета получения 15—20 мл суспензии. Суспензию тщательно перемешивают вращательными круговыми движениями в течение 5—10 мин, дают отстояться 3—5 мин, надосадочную жидкость аккуратно переливают в стерильный пластиковый или стеклянный центрифужный стакан. К образцу почвы вновь добавляют диспергирующую

жидкость в половинном объеме и повторяют процедуру элюции. Надосадочные жидкости после первой и второй элюций объединяют в одном центрифужном стакане и центрифугированием при 1 000 об./мин в течение 15 мин удаляют механические примеси. Надосадок переносят в стерильный центрифужный стакан и микробную взвесь концентрируют центрифугированием при 6 000 об./мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость декантируют, а осадок ресуспендируют в 1 мл стерильного 0,9 %-го раствора натрия хлорида и используют для дальнейшего исследования. Процедуру центрифугирования проводят в отдельных боксовых помещениях или в боксах биологической безопасности III класса ESCO Airstream Class III, либо их аналогах производства других фирм, оборудованных электрическими розетками и УФ-лампами.

Различные порошкообразные вещества, в том числе пищевые продукты и корма, обрабатывают аналогично почве, используя в дальнейшем надосадочную жидкость или раствор в случае растворения вещества.

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 ч 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.

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. Колбу закрывают, тщательно встряхивают в течение 5—10 мин. Для освобождения от грубых частиц взвесь можно профильтровать через 2—3 слоя марли.

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

4.7. Предварительная обработка проб для исследования методом ПЦР

Для получения сыворотки пробирки с кровью отстаивают при комнатной температуре в течение 30 мин до полного образования сгустка. После этого сгусток обводят пастеровской пипеткой и ос-

тавляют при комнатной температуре до образования сыворотки. Затем сыворотку в объеме 1 мл переносят отдельными наконечниками с аэрозольным барьером (пастеровскими пипетками) в стерильные пробирки объемом 1,5 мл. Микроаутоптаты, сыворотка, содержимое везикул, отделяемое язв, фрагменты отторгнутого струпа, мазки из полости носа и спинномозговая жидкость не требуют предварительной обработки. Макроаутоптаты массой 0,1—1 г помещают в стерильную фарфоровую ступку, добавляют стерильный 0,9 %-й раствор хлорида натрия в соотношении 1 : 10, измельчают стерильными ножницами с последующим растиранием пестиком. Полученную 10 %-ю суспензию центрифугируют или через ватный тампон отбирают надосадочную жидкость (0,1—0,2 мл) стерильным наконечником с аэрозольным барьером в стерильные микроцентрифужные пробирки объемом 1,5—2,0 мл с завинчивающимися или защелкивающимися крышками.

Воду, смывы с объектов внешней среды, пробы почвы, пищевых продуктов или кормов, шкур, шерсти предварительно обрабатывают так же, как и для бактериологического исследования, отбирая для исследования методом ПЦР 0,1—0,2 мл водной фазы образцов.

5. Порядок проведения исследования

Все работы по проведению исследования материала подозрительного на наличие возбудителя сибирской язвы проводят с соблюдением требований СП 1.3.1285—03 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)».

Схема проведения анализа представлена на рис. 9 (прилож. 7).

Исследования на сибирскую язву можно разделить на два этапа:

1) обнаружение возбудителя или его компонентов (ДНК, антигенов) в организме больных людей, животных, секционном материале или объектах окружающей среды, с которыми имели контакт заболевшие и которые могли быть источником инфицирования;

2) выделение и идентификация чистой культуры возбудителя с последующим изучением ее свойств.

При исследовании патологического материала от людей и животных готовят мазки из нативных проб, окрашивают их по Граму и люминесцирующими иммуноглобулинами, засевают на плотные и жидкие питательные среды, заражают лабораторных животных и проводят ПЦР-анализ.

При исследовании методом ПЦР материала, в котором предполагается наличие возбудителя сибирской язвы в виде спор, проводится их предварительная герминация с целью последующего обеззараживания и выделения ДНК.

Для анализа проб кожи, шкуры и шерсти к уже указанным методам добавляется реакция преципитации и исключается бактериоскопия и МФА.

Подготовленные для исследования пробы делятся на две части, одну из которых прогревают при 80 °С в течение 20 мин. Из непрогретой и прогретой частей материала проводят высев на плотные и жидкие питательные среды, заражают биопробных животных и проводят ПЦР-анализ. Исследование образцов из объектов окружающей среды осуществляют аналогично без использования реакции преципитации.

Загнивший патологический материал исследуют с помощью реакции преципитации и ПЦР.

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

В лабораториях особо опасных инфекций Центров гигиены и эпидемиологии, в противочумных учреждениях проводят специфическую индикацию, выделение культур и их идентификацию основными методами, используя при наличии возможностей дополнительные методы. Материал от животных (трупов) исследуют всеми методами в ветеринарных лабораториях, специализированных центрах и ветеринарных НИИ.

Выделенные в лабораториях учреждений Федеральной службы культуры B. anthracis после идентификации, вместе с паспортами направляют в вышестоящие учреждения в соответствии с установленным действующими документами порядком.

Культуры, выделенные в учреждениях ветеринарного профиля, направляются для окончательной идентификации во Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии (г. Покров).

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

5.1. Бактериоскопия

5.1.1. Световая микроскопия

Из поступившего патологического материала (от людей и животных) готовят несколько мазков, которые подсушивают на воздухе, фиксируют в спирте с добавлением 3 % перекиси водорода не более 30 мин (прилож. 2.1.), после этого окрашивают по Граму и на капсулу одним из методов (по Ребигеру, Михину, Романовскому-Гимза). В окрашенных мазках из патологического материала сибиреязвенный микроб представляет собой грамположительные палочки, располагающиеся короткими цепочками или попарно. Концы палочек, обращенные друг к другу, резко обрублены, свободные концы обычно закруглены. В отдельных случаях (чаще в мазках от человека или свиней) форма возбудителя сибирской язвы может быть нехарактерной (короткие, толстые или изогнутые, иногда зернистые палочки с вздутием посередине или на конце, возможно наличие «теней» микробов).

Для обнаружения капсул лучшей краской является раствор Ребигера (прилож. 2.2). На всю поверхность фиксированного мазка пипеткой наносят раствор Ребигера и выдерживают 30—60 сек, затем промывают водой и высушивают. В мазках из свежего патологического материала капсула вокруг микроба окрашивается в розовый или красно-фиолетовый цвет, тело микробной клетки – в темно-фиолетовый. В мазках из крови и спинномозговой жидкости палочки с капсулой увеличены, края микроба закруглены.

При окраске мазков из несвежего патологического материала микробы могут быть также несколько увеличены, концы закруглены, морфологическая стройность бацилл нарушена, они как бы «изъедены», иногда остаются «тени», а от капсулы могут оставаться одни обрывки, которые окрашиваются очень слабо.

Для обнаружения спор в некоторых образцах внешней среды после фиксации мазки окрашивают карболовым фуксином по Цилю-Нильсену (прилож. 2.3). После фиксации мазка на стекло кладут полоску фильтровальной бумажки и на нее наливают карболовый фуксин Циля. Мазок с краской подогревают на пламени спиртовки до появления паров (но не до кипения) и краску оставляют на препарате без подогревания еще на 2—3 мин. Бумажку удаляют пинцетом, краску сливают, препарат промывают водой. Затем обесцвечивают 5 %-й серной кислотой до желтоватого оттенка (в течение 3—5 с). Тщательно отмывают препарат водой, ополаскивают 5—10 с 96°-м спиртом, а потом – водой. Докрашивают мазок метиленовой синью Леффлера 2—3 мин, смывают водой и просушивают. Препарат просматривают в микроскопе с иммерсионной системой. В мазках наблюдают палочки синего цвета. Споры, в за-

висимости от степени их жизнеспособности, могут окрашиваться следующим образом: 1) розовые с более интенсивной окраской по периферии – жизнеспособные; 2) равномерно окрашенные в красный цвет – слабо жизнеспособные; 3) синие – не жизнеспособные.

По результатам микроскопического исследования немедленно дают предварительный ответ.

5.1.2. Люминесцентная микроскопия – МФА

Для люминесцентной микроскопии делают мазки-отпечатки из экссудата брюшной полости и органов биопробных животных, мазки-отпечатки из отечной жидкости и внутренних органов людей и животных, мазки из подозрительных колоний, выросших из посевов проб на чашках с питательными средами. Мазки подсушивают на воздухе и фиксируют в этиловом спирте с 3 % перекиси водорода в течение 30 мин. На высохшие фиксированные мазки наносят в рабочих разведениях, указанных на этикетке, диагностические сибиреязвенные люминесцирующие адсорбированные соматические иммуноглобулины. В исходных пробах могут быть обнаружены сибиреязвенные микробы в вегетативной или споровой форме. Мазки из смывов, суспензий, вытяжек из материалов, подозрительных на высокую контаминацию возбудителем сибирской язвы, обрабатывают диагностическими люминесцирующими адсорбированными антиспоровыми иммуноглобулинами.

В случае приготовления мазков непосредственно из нативного материала их окрашивают для увеличения контрастности смесью диагностических иммуноглобулинов и бычьего альбумина, меченого родамином. Для этого готовят отдельно разведения иммуноглобулинов и альбумина в 2 раза меньшие, чем указано на этикетках, смешивают их в соотношении 1 : 1 и наносят на мазки. Например, рабочее разведение люминесцирующих антиспоровых иммуноглобулинов (1) составляет 1 : 16, а альбумина (2) – 1 : 8. Смесь составляют из разведения (1) 1 : 8 и (2) 1 : 4. Дальнейшую обработку окрашенных таким образом мазков проводят аналогично мазкам, окрашенным только люминесцирующими иммуноглобулинами.

Мазки с нанесенными на них люминесцирующими иммуноглобулинами помещают во влажную камеру (чашку Петри или эксикатор с увлажненной 0,9 %-м раствором натрия хлорида или дистиллированной водой фильтровальной бумагой или комочком ваты), выдерживают для окрашивания при 37 °С в течение 20 мин. После этого их тщательно промывают два раза по 10 мин в 0,9 %-м растворе натрия хлорида, затем в дистиллированной воде и высушивают на воздухе. Препараты покрывают покровными стеклами или просматривают ex tempore без покровных стекол. Мазки микроскопируют в люминесцентном микроскопе с системой подобранных свето-

фильтров и иммерсионным объективом. При этом необходимо пользоваться нефлуоресцирующим иммерсионным маслом. В случае его отсутствия применяют смесь, содержащую 1 часть 0,9 %-го раствора натрия хлорида и 9 частей химически чистого глицерина. Споры и вегетативные клетки сибиреязвенного микроба, окрашенные люминесцирующими иммуноглобулинами, дают яркое свечение периферии клеток, имеющих характерную для данного вида морфологию. Такое свечение называется специфическим, в отличие от неспецифического, характеризующегося равномерным неярким свечением всей поверхности клеток. Для учета результатов используется арбитражная система оценки по интенсивности свечения и количеству специфически светящихся клеток:

- 4^+ – большое количество специфически светящихся клеток, расположенных длинными цепочками (вегетативная форма), очень яркая флуоресценция по периферии споры или вегетативной клетки, четко контрастирующая с темным телом клетки;
- 3^+ – яркая флуоресценция периферии клетки, клетки расположены отдельными группами (цепочками) и единично;
- 2^+ или 1^+ – слабое свечение периферии клетки, не контрастирующее с ее телом.

Свечение спор и вегетативных клеток на 4^+ и 3^+ позволяет подозревать наличие в исследуемом материале возбудителя сибирской язвы и может служить основанием для выдачи предварительного положительного ответа.

Необходимо учитывать, что специфичность данного метода составляет не более 70 %, ввиду наличия перекрестно-реагирующих антигенов у представителей группы Bacillus cereus.

5.2. Посев на питательные среды, бактериологический метод

5.2.1. Подготовленный для исследования материал («Подготовка проб к бактериологическому исследованию») засевают на чашки Петри с МПА, агаром Хоттингера (pH 7,2), селективную дифференциально-диагностическую среду с 0,01 % натрия фенолфталеинфосфата (прилож. 1.1) и пробирку с МПБ. Для засева одной пробы желательно использовать не менее 5 чашек. Поверхность агара перед посевом должна быть совершенно сухой. Посев необходимо производить с помощью шпателя, предварительно нанося на поверхность агара 1—2 капли (0,1 мл) исследуемого материала. Если материал значительно загрязнен посторонней микрофлорой (почва, корма, смывы с поверхностей и пр.), делают посевы методом истощения, распределяя материал шпателем по поверхности агара с переносом на 2—3 чашки. При исследовании материала, слабо загрязненного посторонней микрофлорой (кровь,

пунктаты из карбункула, органы биопробных животных), посев можно проводить петлей без истощения, используя при этом МПА, агар Хоттингера, кровяной агар и МПБ. Посевы помещают в термостат при (36 ± 1) °С на 18—20 ч и при отсутствии роста выдерживают при той же температуре 48 ч.

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

Из бульонной культуры делают мазки, окрашивают по Граму и исследуют под микроскопом. В мазках из бульонной культуры обнаруживают типичные цепочки, состоящие из сибиреязвенных палочек, из бульонной культуры с диффузным ростом – отдельные или парно расположенные палочки. Для получения чистой культуры из бульона делают высевы на плотные питательные среды петлей для получения изолированных колоний.

5.2.3. На следующий день плотные питательные среды просматривают визуально и под микроскопом при малом увеличении.

Кроме колоний сибиреязвенного микроба на средах может наблюдаться рост спорообразующих сапрофитов, морфологически трудно отличимых от B. anthracis. Возбудитель сибирской язвы образует плоские матово-серые шероховатые (R-форма) колонии. Центр их иногда затемнен, периферия бахромчатая с локонообразными отростками. Встречаются колонии с менее выраженной шероховатостью и без отростков, которые также подлежат дальнейшей идентификации. Колонии B. anthracis трудно снимаются петлей с поверхности агара, в то время как колонии близкородственных сапрофитов снимаются легко. Для выделения чистой культуры с питательного агара отбирают не менее 10 шероховатых колоний, при отсутствии такого количества – все шероховатые колонии.

Примечание: при оценке морфологии колоний следует учитывать существование редких вариантов сибиреязвенного микроба II типа, формирующих слизистые колонии в SM-форме на обычных питательных средах.

5.2.4. Посевы на селективной дифференциально-диагностической среде с фенолфталеинфосфатом натрия перед просмотром обрабатывают парами аммиака. Для этого в отдельную крышку от чашки Петри помещают фильтровальную бумагу и наливают на нее 1—2 мл аммиака водного (29 %-го, концентрированного). Затем чашку с посевами (агаром вверх), без крышки, помещают на несколько секунд (пока не порозовеют колонии сапрофитов) в крышку с аммиаком. Таким образом обрабатывают все посевы. В силу того, что си-

биреязвенный микроб не образует или продуцирует фосфатазу слабо, его колонии, как правило, не изменяют своего цвета. Колонии спорообразующих сапрофитов, в том числе и B. cereus, под действием паров аммиака приобретают розовый или красный цвет. С дифференциально-диагностической среды для выделения чистой культуры отбирают визуально и с помощью микроскопа при малом увеличении все колонии, не изменившие своего цвета после обработки парами аммиака или слабо порозовевшие.

5.2.5. Из всех отобранных колоний делают мазки на двух или более предметных стеклах. Мазки фиксируют и окрашивают двумя способами – по Ребигеру (или по Граму) и сибиреязвенной люминесцирующей соматической сывороткой. При просмотре мазков учитывают характерную для сибиреязвенного микроба морфологию (длинные нити, концы палочек обрублены), при окраске люминесцирующими сыворотками – специфическое свечение на 4^+ или 3^+. Для идентификации отбирают только колонии чистой культуры, которые состоят из характерных для сибиреязвенного микроба палочек. Их отсевают на секторы МПА или агара Хоттингера. Материал из всех других отобранных колоний рассевают петлей на отдельных чашках Петри с МПА или агаром Хоттингера для получения изолированных колоний.

На этом этапе исследования для получения чистой культуры сибиреязвенного микроба важно проводить рассев на неселективной среде. Посевы помещают в термостат на 18—20 ч, после чего проводят учет и отбор колоний для дальнейшей идентификации по полной схеме лабораторного исследования.

Из изолированных колоний повторно делают мазки, их фиксируют и окрашивают, как описано выше. При отсутствии достаточного количества культуры исследование проводят на следующие сутки после накопления биомассы.

5.3. Биологический метод

В день поступления материала, одновременно с бактериоскопией и посевами на питательные среды с целью выделения возбудителя сибирской язвы, в обязательном порядке проводят биологическую пробу на восприимчивых лабораторных животных.

Для постановки биологической пробы используют белых беспородных мышей (массой 18—2 г), морских свинок (массой 350—400 г) или золотистых хомяков (массой 60—80 г). Исследуемый материал, подготовленный соответствующим образом (раздел «Подготовка проб к исследованию»), суспендируют в небольшом объеме стерильного 0,9 %-го раствора хлорида натрия и вводят подкожно во внутреннюю поверхность бедра 2 мышам в объеме 0,2—0,5 мл, 2 морским свинкам или 2 золотистым хомякам в объе-

ме 0,5—1,0 мл. Гибель зараженных животных наступает через 1—3 сут., иногда позже. При вскрытии трупов биопробных животных, павших от сибирской язвы, отмечают характерный для сибиреязвенной инфекции студенистый геморрагический отек подкожной клетчатки на месте введения материала, гиперемию внутренних органов, увеличение селезенки и несвернувшуюся кровь. Из тканей и органов павших животных делают мазки-отпечатки, а так же посевы на МПА или агар Хоттингера и селективную среду. Мазки-отпечатки фиксируют в спирте с 3 % перекиси водорода в течение 30 мин, а затем окрашивают раствором Ребигера или метиленовой синькой. В мазках при микроскопии сибиреязвенные бациллы расположены короткими цепочками, попарно или поодиночке, окружены розовой капсулой, зачастую сливающейся вокруг групп микробов. В посевах при просмотре чашек вырастают крупные шероховатые колонии с бахромчатой периферией. Идентификацию выросших колоний проводят выше описанными методами.

В случаях, когда чистая культура возбудителя из посевов исходного материала на питательные среды получена раньше, чем наступает гибель зараженных этим материалом животных, суточной бульонной культурой заражают дополнительно двух мышей или морских свинок в дозах, указанных выше.

Наблюдение за животными ведут в течение 10 сут., после чего их исследуют, как описано выше. В целях ускорения исследования количество заражаемых белых мышей увеличивают до 6—10 особей и по одной мыши от каждой пробы забивают через 2—3 сут. после введения исходного инокулюма. В этом случае при вскрытии особое внимание уделяют месту введения. Если в исходном материале имеется достаточное количество сибиреязвенного микроба, то на месте введения можно обнаружить отек подкожной клетчатки. В мазках-отпечатках с места введения выявляются капсульные формы микроба, а в посевах – рост типичных колоний.

5.4. Иммунно-серологические и аллергологические методы исследования

5.4.1. Реакция преципитации по Асколи

Реакция позволяет в короткие сроки обнаружить сибиреязвенный антиген в экстрактах из струпьев язв больных, органов умерших от сибирской язвы людей, шкур и органов павших животных. Исследованию в реакции Асколи подвергают в том числе и загнивший биоматериал. Для постановки реакции необходимы: преципитирующая сибиреязвенная сыворотка, экстракт из исследуемого материала и сибиреязвенный бактерийный антиген для контроля.

Перед постановкой реакции свежий биоматериал выдерживают в термостате в течение 18—20 ч. Экстрагирование проводят го-

рячим и холодным способами. При этом следует учитывать, что в экстрактах, полученных горячим способом, меньше преципитиногенов.

Для получения экстракта из патологического материала и струпьев горячим способом материал измельчают, заливают 0,9 %-м раствором натрия хлорида с 0,3 %-м раствором карболовой кислоты в соотношении 1 : 10 и кипятят в течение 30—40 мин, при холодном способе – оставляют для экстрагирования на 16—18 ч при комнатной температуре. Полученные экстракты фильтруют до полной прозрачности через фильтровальную бумагу или вату, предварительно смоченные 0,9 %-м раствором хлорида натрия. В узкие пробирки наливают 0,2—0,3 мл прозрачной сибиреязвенной преципитирующей сыворотки, а затем пастеровской пипеткой осторожно наслаивают на нее такое же количество полученного экстракта. Если реакция положительная, то на границе соприкосновения жидкостей не позднее 15 мин должно появиться мутно-белое кольцо. Реакция оценивается знаком (+). При сомнительной реакции появление кольца наблюдается позднее 15 мин (±). Если кольцо отсутствует, то реакция оценивается как отрицательная (–). Одновременно необходимо ставить три контрольных пробы: преципитирующая сыворотка плюс коммерческий стандартный сибиреязвенный антиген; преципитирующая сыворотка плюс экстрагирующая жидкость; нормальная лошадиная сыворотка плюс коммерческий стандартный сибиреязвенный антиген. Все контроли, кроме первого, должны быть отрицательными.

Исследование кожевенного и мехового сырья на сибирскую язву в реакции преципитации по Асколи проводят в соответствии с «Наставлением по исследованию кожевенного и мехового сырья реакцией преципитации», утвержденным Главным управлением ветеринарии Минсельхоза СССР 25 мая 1971 г.

Необходимо учитывать, что применяемые в настоящее время различные виды кислот и щелочей для выделки кожевенного сырья могут влиять на результаты реакции преципитации. Оптимальное значение pH экстрактов должно находиться в пределах 6,0—8,0. Кроме того, данный метод характеризуется недостаточно высокой чувствительностью, так как нередко дает отрицательный результат при исследовании заведомо сибиреязвенного материала.

Реакцию Асколи используют как экспресс-метод для обнаружения специфических сибиреязвенных антигенов у исследуемых культур. Для этого в 0,25—0,5 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида ресуспендируют петлю суточной агаровой культуры. Экстрагирование проводят горячим методом, а постановку реакции выше описанным способом. Учет результатов реакции проводят в течение 3 мин.

5.4.2. МФА для выявления специфических антител в сыворотке крови

В исключительных случаях можно проводить поиск противосибиреязвенных антител у больных непрямым МФА. С этой целью используют сыворотку диагностическую антивидовую против иммуноглобулинов человека люминесцирующую сухую. Для получения вегетативной культуры сибиреязвенного микроба используют споры вакцины СТИ, которые засевают на чашку с агаром Хоттингера (pH 7,2) и инкубируют в термостате при (36 ± 1) °С в течение 18—20 ч. После этого готовят суспензию вегетативных клеток на 0,9 %-м растворе натрия хлорида, доводя плотность инокулюма до ОСО мутности 10 ед. ГИСК им. Л. А. Тарасевича. Полученную суспензию тщательно встряхивают и готовят из нее мазки на хорошо обезжиренных предметных стеклах, по 8 мазков на каждом стекле. Мазки высушивают на воздухе, фиксируют 30 мин в спирте с 3 % перекиси водорода, вновь высушивают и расчерчивают восковым карандашом. При постановке этой реакции желательно использовать «свежие» мазки, при необходимости их можно хранить в холодильнике в закрытых чашках Петри в течение 3 суток.

Исследуемую сыворотку от больного человека инактивируют на водяной бане при 56 °С в течение 20 мин. В качестве отрицательного контроля используют сыворотку здорового человека, которую обрабатывают аналогичным образом. Затем сыворотки титруют в пробирках или полистироловых планшетах в 0,9 %-м растворе натрия хлорида с двукратным шагом, отбирают с помощью пастеровской пипетки, начиная с большего разведения, и наносят капли на мазки с вегетативной культурой сибиреязвенного микроба. Стекла помещают на дно чашки Петри, закрывают крышкой и выдерживают 20—30 мин при 37 °С. Затем мазки промывают дважды по 10 мин в забуференном 0,9 %-м растворе натрия хлорида и 10 мин в дистиллированной воде. Стекла сушат на воздухе при комнатной температуре, после чего на мазки наносят люминесцирующую сыворотку против иммуноглобулинов человека в рабочем титре, обозначенном на ампуле. Мазки окрашивают и промывают так же, как и в первом случае. Микроскопию проводят с иммерсионной системой. Для оценки интенсивности свечения используют четырехкрестовую систему. Положительным результатом считается свечение на 3^+ и 4^+.

У лиц, больных сибирской язвой, специфические антитела начинают появляться уже с 5-х сут. после начала болезни, и их титр нарастает до 21 и более суток. Увеличение титра антител можно проследить при исследовании парных сывороток с интервалом 5—7 дней. В МФА титры антител могут доходить до

1 : 640—1 : 1280, диагностическими считаются титры – 1 : 16—1 : 32 и 4-кратное нарастание титров при повторном исследовании.

5.4.3. Реакция непрямой гемагглютинации

Для постановки серологических реакций РНГА (макро- и микрометоды) и РТНГА используется эритроцитарный иммуноглобулиновый диагностикум для выявления сибиреязвенных спор в объектах внешней среды. Исследование материала проводится согласно инструкции по применению.

5.4.4. Кожно-аллергическая проба с сибиреязвенным аллергеном антраксином

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

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

Диагноз сибирской язвы подтверждается при наличии положительной антраксиновой пробы с оценкой от 2^+ до 4^+. При наличии сомнительной (±) или слабоположительной (+) пробу повторяют через 5—7 дней. Отрицательная реакция на антраксин не исключает диагноза сибирской язвы.

Для диагностики сибирской язвы у свиней применяют сибиреязвенный аллерген диагностический. Аллерген вводят с соблюдением всех правил асептики строго внутрикожно в объеме 0,2 мл в среднюю часть наружной поверхности уха. На месте инъекции должен образовываться плотный инфильтрат размером с горошину, который исчезает через 15—20 мин. Кожно-аллергическую реакцию учитывают через 6 или 24 ч, измеряя кутиметром зону ин-

Таблица

Оценка результатов пробы с антраксином

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

фильтрата и увеличение толщины кожной складки в месте введения аллергена по сравнению с нормой. Оценку реакции проводят по трехбалльной шкале:

• (–) *реакция отрицательная* – отсутствие инфильтрата и гиперемии в месте введения препарата, утолщение кожной складки не более чем на 2 мм по сравнению с исходной;

• (±) *реакция сомнительная* – наличие инфильтрата до 10 мм в диаметре, гиперемия слабая или может отсутствовать, утолщение кожной складки до 3 мм;

• (+) *реакция положительная* – наличие инфильтрата и гиперемии диаметром свыше 10 мм, утолщение кожной складки на 3 мм и более.

При наличии положительной (+) реакции через 6 или 24 ч после инъекции животное признают больным и изолируют. Если через 6 или 24 ч после инъекции аллергена у животного регистрируют отрицательную реакцию, то его признают здоровым. При регистрации

сомнительной (±) реакции через 24 ч аллерген вводят повторно в кожу другого уха. Если после повторного введения аллергена через 6 или 24 ч у животного регистрируют положительную или сомнительную реакцию, то его признают больным и изолируют.

5.4.5. ИФА для выявления специфических антител в сыворотке крови

Этот метод используется за рубежом в качестве альтернативы пробы с антраксином у человека. В настоящее время диагностический набор для выявления специфических иммуноглобулинов классов М и G в сыворотке людей, позволяющий дифференцировать заболевание и ответ на вакцинацию, разработан у нас в стране. Он прошел комиссионные испытания, но пока не выпускается.

5.5. Молекулярно-генетические методы исследования

Работу выполняют в соответствии с методическими указаниями МУ 1.3.1794—03 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I—II групп патогенности».

5.5.1. Обеззараживание проб для исследования методом ПЦР

Обеззараживание материала проводят согласно методическим указаниям МУ 3.5.5.1034—01 «Обеззараживание исследуемого материала, инфицированного бактериями I—IV групп патогенности при работе методом ПЦР». Обработка включает два этапа: перевод спор в вегетативную форму и обработка лизирующим буфером, содержащим гуанидинтиоцианат.

А) Герминация спор и обработка вегетативных форм B. anthracis пенициллином. Предварительно подготовленный нативный материал в количестве 0,1 мл или одну бактериологическую петлю 18-часовой агаровой культуры подозрительных колоний засевают в стеклянные пробирки с 0,9 мл бульона Хоттингера pH 7,4 и инкубируют с аэрацией при (36 ± 1) °С в течение 2,5 ч. После этого в пробирки добавляют пенициллин (до конечной концентрации 1 000 ЕД/мл) и инкубируют с аэрацией 15 мин при (36 ± 1) °С. Затем прогревают при 100 °С в течение 10 мин на водяной бане. Допускается прогревание проб, обработанных пенициллином, в твердотельном термостате при 100 °С, для чего содержимое стеклянной пробирки переносят в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5—1,7 мл с завинчивающейся или защелкивающейся крышкой. При необходимости перед прогреванием пробы могут быть сконцентрированы путем центрифугирования при 12 000 об./мин в течение 15 мин, с последующим ресуспендированием осадка в 100 мкл 0,9 %-го раствора хлорида натрия.

Б) Обработка лизирующим буфером с гуанидинтиоцианатом. После прогревания при 100 °С в течение 10 мин из пробирок отбирают по 0,1 мл материала и переносят в отдельные микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл с 300 мкл лизирующего раствора, содержащего 6 М гуанидинтиоцианата (прилож. 2.5). Затем инкубируют при 65 °С в течение 15 мин.

Обработанные таким образом пробы считаются обеззараженными и всю последующую работу проводят как с незаразным материалом.

Для проведения этого этапа и дальнейшего выделения ДНК используют коммерческие наборы, содержащие 6 М гуанидинтиоцианата (прилож. 5) или готовят необходимые реактивы самостоятельно (прилож. 2).

5.5.2. Выделение ДНК

Для выделения ДНК используют метод нуклеосорбции. Если применяются коммерческие наборы для выделения, то работу проводят в соответствии с инструкцией по применению препаратов. При использовании самостоятельно подготовленных реагентов работу осуществляют следующим образом. В пробирки после прогревания с лизирующим буфером при 65 °С в течение 15 мин добавляют 25—30 мкл сорбента, который предварительно тщательно перемешивают на микроцентрифуге/встряхивателе. Пробирки инкубируют при комнатной температуре в течение 10 мин, перемешивая их на микроцентрифуге/встряхивателе каждые 2 мин, после чего центрифугируют при 8 000—12 000 об./мин в течение 30 с. Надосадочную жидкость удаляют, используя наконечник с аэрозольным барьером.

К осадку добавляют 300 мкл раствора для первой отмывки ОР-1, перемешивают содержимое пробирки до гомогенного состояния и центрифугируют при 8 000—12 000 об./мин в течение 30 с. Супернатант удаляют, а к осадку добавляют 500 мкл раствора для второй отмывки ОР-2, перемешивают в течение 30 с и центрифугируют при аналогичных условиях. Отмывку ОР-2 повторяют ещё раз. После удаления надосадочной жидкости добавляют 400 мкл ацетона, тщательно перемешивают и центрифугируют при 8 000—12 000 об./мин в течение 30 с. Супернатант тщательно удаляют, а осадок высушивают при 65 °С в течение 10 мин. После этого добавляют 30—50 мкл ТЕ-буфера и инкубируют при 65 °С в течение 10 мин, перемешивая на микроцентрифуге/встряхивателе каждые 2 мин. Затем пробирки центрифугируют при 8 000—12 000 об./мин в течение 1 мин, супернатант используют для постановки ПЦР.

5.5.3. Проведение ПЦР для специфической индикации и идентификации B. anthracis

Для проведения реакции используют тест-системы для выявления ДНК B. anthracis, разрешенные к применению в установлен-

ном порядке, позволяющие проводить учет результатов методами электрофореза в агарозном геле или методом ПЦР в режиме реального времени, либо с флуоресцентной детекцией по «конечной точке». Работу проводят в соответствии с инструкциями к диагностическим тест-системам.

5.6. Идентификация культур

Все выделенные культуры, подозрительные на принадлежность к B. anthracis, обязательно подвергают дальнейшему изучению биологических свойств, служащих критерием видовой идентификации, а при необходимости и целого ряда дополнительных свойств, являющихся основой для внутривидового типирования.

В предлагаемой схеме (прилож. 7, рис. 10) представлены тесты идентификации и внутривидовой дифференциации сибиреязвенного микроба.

Тесты разделены на три группы. Тест группы I является ускоренным идентификационным и одновременно позволяющим дифференцировать штаммы по плазмидному составу. Метод ускоренной идентификации заключается в использовании ПЦР в мультиплексном варианте. Для этого может быть использована тест-система «АмплиСенс Bacillus anthracis – FRT» или другие разрешенные к применению в установленном порядке тест-системы с праймерами к плазмидным генам капсуло- и токсинообразования и специфическим хромосомным локусам сибиреязвенного микроба.

Тесты группы II являются основными, из них тесты 1—6 служат опорными.

Тесты группы III являются дополнительными методами изучения выделенных сибиреязвенных культур.

5.6.1. Основные идентификационные тесты (тесты группы II)

5.6.1.1. Морфология B. anthracis

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

Морфологию спор определяют в культуре, полученной на плотной питательной среде при культивировании в течение 3—7 суток. Существует несколько способов окраски спор, основанных

на том, чтобы сделать проницаемой для краски их плотную оболочку (Ауэски, Пешкова, Циля-Нильсена). Для дифференциации от других грамположительных бацилл мазки окрашивают сибиреязвенными люминесцирующими сыворотками, ориентируясь при микроскопии на морфологию клеток и специфическое свечение (ярко-зеленая периферия и более темная сома клеток).

Приготовленные мазки фиксируют в фиксирующей жидкости, содержащей перекись водорода (прилож. 2.1).

5.6.1.2. Характер роста на плотных и в жидких питательных средах

Характер роста на агаровых средах определяют визуально невооруженным глазом или через лупу, а также под микроскопом, для чего чашку помещают на столик микроскопа вверх дном и просматривают колонии в проходящем свете при малом увеличении и с суженной диафрагмой. Оценивают колонии по их морфологии: величине, форме, виду, цвету, характеру поверхности и края, прозрачности, структуре, консистенции, а также по специфическому запаху. На МПА и агаре Хоттингера возбудитель сибирской язвы формирует крупные шероховатые матовые серые сухие колонии в R-форме, с «шагреневой» поверхностью, неровными краями и отходящими от них волнистыми отростками, напоминающими при просмотре в микроскопе (малое увеличение) локоны волос или львиную гриву. Колонии сибиреязвенного микроба на плотных питательных средах отличаются от колоний спорообразующих сапрофитов меньшими размерами, большей шероховатостью и более выраженными «локонами» по периферии. Колония сибиреязвенного микроба с трудом берется бактериологической петлей, при этом за петлей поднимается тяж бактериальной массы. Агаровая культура сибиреязвенного микроба имеет специфический слегка ароматический запах.

При использовании дифференциально-диагностической среды с натрия фенолфталеинфосфатом учитывают одновременно два важных диагностических признака – характер выросших колоний и тест на щелочную фосфатазу (п. 5.2.4).

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

5.6.1.3. Тест на подвижность

Одним из наиболее постоянных для сибиреязвенного микроба признаков является отсутствие подвижности, в отличие от большинства спорообразующих сапрофитов. Можно определить под-

вижность путем высева культуры уколом в столбик полужидкого (0,2—0,3 %) агара. Посевы выдерживают в термостате при температуре (36 ± 1) °С в течение 18—20 ч. В полужидком агаре рост сибиреязвенного микроба наблюдается только по следу укола, а окружающая среда остается прозрачной. Подвижные микробы дают диффузный рост. Простым методом определения подвижности является микроскопическое исследование в «висячей» или раздавленной капле, а также в камере Горяева 18—20-часовой бульонной культуры. Однако описаны и неподвижные варианты B. cereus и других сапрофитов.

5.6.1.4. Обнаружение капсулы in vito

Обнаружение капсулы in vitro проводят посевом культур на 1 % бикарбонатно-сывороточный агар или среду ГКИ (прилож. 1.2 и 1.3). Инкубацию на 1 %-м бикарбонатном агаре проводят при (36 ± 1) °С в анаэростатах при содержании 5—50 % CO_2 или в эксикаторе с притертой крышкой. На дно эксикатора (на каждый литр объема) насыпают 0,4 г пищевой соды и наливают 0,35 мл концентрированной соляной кислоты или 2 г $NaHCO_3$ + 10 мл 20 % H_2SO_4. После внесения чашек Петри с посевами эксикатор закрывают крышкой и слегка наклоняют, соединяя соду с кислотой. Просматривают посевы через 18—24 ч. Капсулообразующие культуры вырастают в виде крупных гладких блестящих слизистых колоний. В мазках, окрашенных после их фиксации одним из методов (по Ребигеру, капсульно-соматической сибиреязвенной люминесцирующей сывороткой), видны цепочки палочек, окруженные хорошо выраженной капсулой.

Пробирки со средой ГКИ с посевами закрывают стерильными резиновыми пробками и помещают в термостат при (36 ± 1) °С. Через 30—120 мин инкубирования у отдельных сибиреязвенных клеток начинается капсулообразование, а спустя 16—18 ч все или большинство сибиреязвенных клеток образуют капсулу. В мазках из посевов, окрашенных одним из описанных методов, видны длинные цепочки палочек, окруженных капсулой.

5.6.1.5. Обнаружение капсулы in vivo

При вскрытии биопробных животных, которым введена исследуемая культура, делают мазки из перитонеального экссудата и крови сердца и мазки-отпечатки из органов. Мазки фиксируют и окрашивают по Ребигеру или метиленовой синькой. В мазках от животных микробы расположены короткими цепочками, попарно или поодиночке, окружены розовой капсулой. Способность к капсулообразованию in vivo из всех представителей рода Bacillus присуща только возбудителю сибирской язвы. Встречающиеся в природе атипичные штаммы, не образующие капсулу, но по другим

тестам соответствующие сибиреязвенному микробу, требуют дополнительных исследований.

5.6.1.6. Чувствительность к сибиреязвенным бактериофагам

Сибиреязвенный микроб лизируется сибиреязвенными фагами («Гамма», «К», Fah-ВНИИВВиМ и др.). Пробу с фагом ставят следующим образом. Свежеприготовленные чашки с агаром Хоттингера или МПА перед постановкой пробы подсушивают в термостате. Расчерчивают дно чашки снаружи на квадраты со стороной 2 см. Бактериологической петлей или пипеткой на каждый квадрат наносят каплю 5—6-часовой бульонной культуры сибиреязвенного микроба. Чашку с приоткрытой крышкой подсушивают 30 мин в термостате, а затем в центр подсохшей капли наносят петлей каплю цельного сибиреязвенного бактериофага. Результаты учитывают через 5—6 ч инкубации чашек при (36 ± 1) °С, просматривая их под малым увеличением микроскопа. В более поздние сроки через 12—24 ч просматривают чашки невооруженным глазом. В случае положительного результата на месте нанесения капли бактериофага наблюдается полное или частичное отсутствие роста в виде округлого просветления. Допускается постановка пробы с фагом методом стекающей капли в пробирках или чашках с агаром Хоттингера или МПА.

5.6.1.7. Тест на гемолиз

Для проведения этого теста готовят МПА или агар Хоттингера (pH 7,2) с 3—5 % дефибринированной крови барана (прилож. 1.4). Посев испытуемых культур производят бактериологической петлей секторами и инкубируют в термостате при (36 ± 1) °С в течение 18—20 ч, после чего учитывают результат. В эти сроки сибиреязвенный микроб не лизирует эритроциты барана в отличие от большинства родственных спорообразующих сапрофитов, образующих широкую зону гемолиза вокруг выросших колоний.

5.6.1.8. Тесты на чувствительность к пенициллину

5.6.7.8.1. Тест «жемчужного ожерелья». Перед постановкой пробы остуженный до 45 °С 2 % питательный агар разливают по 10 мл в 3 пробирки. В первую добавляют пенициллин из расчета 0,5 ЕД/мл, во вторую – 0,05 ЕД/мл, третья – без антибиотика – остается контрольной. Содержимое каждой пробирки выливают в чашку Петри. После застывания среды дно чашек снаружи размечают на квадраты или кружки, на которых пишут номера анализа. На обозначенные участки наносят по одной капле изучаемых 3—6-часовых бульонных культур. На одной чашке может быть поставлено до 10 проб. Посевы инкубируют при (36 ± 1) °С. Не позже 3 ч просматривают рост под микроскопом с иммерсионным объективом, предварительно накрыв каждый отмеченный участок по-

кровным стеклом. На среде, содержащей пенициллин, видны шарообразной формы бактериальные клетки сибиреязвенного микроба, расположенных в виде цепочек, напоминающих ожерелье из жемчуга. Спорообразующие сапрофиты, как правило, устойчивые к пенициллину, имеют обычную бациллярную форму. В контрольной среде без пенициллина сибиреязвенный микроб формирует длинные цепи палочек.

5.6.1.8.2. Модификация теста «жемчужного ожерелья». К бульону Хоттингера (pH 7,2) добавляют стерильно 20 % инактивированной лошадиной сыворотки, 0,05 и 0,5 ЕД/мл пенициллина. Среды разливают с соблюдением стерильности в пробирки по 2—3 мл и засевают по 2 капли бульонной или петлю агаровой культуры, взятой для исследования. Пробирки с посевами инкубируют не более 3 ч при (36 ± 1) °С. Затем делают мазки, фиксируют их, и окрашивают по Ребигеру или метиленовой синькой.

5.6.1.8.3. Определение чувствительности к пенициллину дискодиффузионным методом. Из колоний суточных агаровых культур готовят взвесь микробов на 0,9 % растворе натрия хлорида, доводя плотность инокулюма до ОСО мутности 10 ед. ГИСК им. Л. А. Тарасевича. Эту взвесь в объеме 0,3 мл наносят на поверхность питательной среды Мюллера-Хинтона или агара Гивенталя-Ведьминой (АГВ) и равномерно распределяют шпателем. Чашки выдерживают 15 мин при комнатной температуре для впитывания жидкости. Затем на поверхность засеянной питательной среды пинцетом накладывают коммерческий диск с 10 мкг пенициллина. Посевы выдерживают 15 мин при комнатной температуре, а затем, перевернув чашки вверх дном, инкубируют при (36 ± 1) °С в течение 18—20 ч (не более). Измеряют диаметр зон задержки роста вокруг дисков, включая диаметр самого диска, с точностью до 1 мм. Мелкие колонии в пределах зоны задержки роста не учитывают. При расплывчатых краях зоны или при зонах с двойными контурами измеряют диаметр зоны по наиболее четкой границе. Типичные штаммы сибиреязвенного микроба, чувствительные к пенициллину, характеризуются зоной задержки роста 26 мм и больше, близкородственные сапрофиты – 16 мм и меньше.

5.6.2. Дополнительные методы изучения выделенных культур B. anthracis (тесты группы III)

5.6.2.1. Определение чувствительности сибиреязвенного микроба к антибиотикам

Большинство природных штаммов B. anthracis чувствительно ко многим используемым в практике антибиотикам. Однако встречаются и природные изоляты, которые в той или иной степени ус-

тойчивы к различным антибиотикам, что затрудняет проведение лечебных мероприятий в случае заражения таким штаммом. Определение чувствительности штаммов сибиреязвенного микроба, выделенных от больных, является необходимой мерой для выбора наиболее эффективного препарата для лечения тяжелых форм сибирской язвы.

Для определения чувствительности B. anthracis к антибактериальным препаратам можно использовать метод серийных разведений антибиотиков или дискодиффузный метод.

При определении чувствительности сибиреязвенного микроба с помощью ДДМ используют типичные колонии из 16—18-часовых агаровых культур. Из выросших колоний готовят взвесь микробов в 0,9 %-м растворе натрия хлорида, доводя плотность инокулюма до ОСО мутности 10 ед. ГИСК им. Л. А. Тарасевича. Эту взвесь в объеме 0,3 мл наносят на поверхность питательной среды Мюллера-Хинтона или АГВ и равномерно распределяют шпателем. Чашки выдерживают 15 мин при комнатной температуре для впитывания жидкости. Диски накладывают пинцетом на поверхность засеянной питательной среды на одинаковом расстоянии один от другого, отступив около 2 см от стенки чашки (не более 4 дисков), выдерживают 15 мин при комнатной температуре, а затем, перевернув их вверх дном, инкубируют при (36 ± 1) °С в течение 18—20 ч (не более). Измеряют диаметр зон задержки роста вокруг дисков, включая диаметр самого диска, с точностью до 1 мм. Мелкие колонии в пределах зоны задержки роста не учитывают. При расплывчатых краях зоны или при зонах с двойными контурами измеряют диаметр зоны по наиболее четкой границе.

Для метода серийных разведений используют суспензию той же концентрации микробных клеток, нанося ее небольшими каплями с помощью штампа-репликатора или касанием пипетки с тонким концом на агаровые пластинки среды Мюллера-Хинтона или АГВ с разными концентрациями антибактериальных препаратов, начиная с чашек с минимальным содержанием антибиотиков. Посевы инкубируют 18—24 ч при температуре (36 ± 1) °С. С помощью штампа-репликатора можно одновременно изучить антибиотикограммы 50 культур, что значительно экономит средства и время. Чувствительность/устойчивость культур определяют по минимальной подавляющей концентрации (МПК, мг/л или мкг/мл) препарата, угнетающей рост возбудителя на среде культивирования.

Интерпретация результатов

Интерпретацию результатов проводят путем их сопоставления с пограничными значениями МПК и диаметров зон подавления роста возбудителя (табл. прилож. 3). В таблице даны пограничные

значения МПК и зон подавления роста для чувствительных и устойчивых культур. Между этими показателями находятся значения для культур с промежуточной устойчивостью. Необходимо учитывать результаты определения МПК и зон подавления роста для контрольных штаммов *B. anthracis* СТИ и *Staphylococcus aureus* АТСС 25923 на данной серии питательной среды. Изменения МПК и диаметров зон подавления роста для контрольных штаммов, выходящие за пределы допустимых значений, могут свидетельствовать о несоответствии качества сред или дисков с антибактериальными препаратами и потребовать их замены. Увеличение МПК для исследуемых штаммов, по сравнению с контрольным штаммом *B. anthracis* СТИ, может свидетельствовать о тенденции к нарастанию устойчивости культур, что требует изменения схемы терапии данным антибиотиком или использования для лечения и профилактики другого, более эффективного антибактериального препарата.

В паспорте штамма должны быть указаны значения МПК и диаметры зон подавления роста для всех исследованных препаратов с интерпретацией результатов исследования: культура чувствительна, устойчива или имеет промежуточную устойчивость.

5.6.2.2. Метод определения гемолитической и протеолитической активности

Определение проводят в соответствии с методическими рекомендациями «Определение гемолитической активности у сибиреязвенного микроба» (М.,1989). С этой целью готовят двухслойный агар, используя в качестве первого слоя 1 % агар Дифко на 0,9 %-м растворе хлорида натрия, который разливают в чашки Петри по 20 мл. Для второго слоя готовят 0,7 %-й агар на 0,9 %-м растворе хлорида натрия, в который после охлаждения вносят следующие ингредиенты: для проверки гемолитической активности – 6 % трижды стерильно отмытых в 0,9 %-м растворе хлорида натрия эритроцитов барана; для определения протеолитической активности – желатин, казеин, бычий сывороточный альбумин и гемоглобин в концентрации 0,4 %. После полного застывания верхнего слоя в агаровых пластинках пробойником делают по 6—7 лунок в каждой чашке, дно которых заливают каплей расплавленного 1 % агара.

В лунки вносят по 0,1 мл 2-суточной бульонной культуры изучаемых штаммов. Учет производят через 48 ч инкубации при температуре (36 ± 1) °С для выявления гемолитической и через 24 ч – при выявлении протеолитической активности. В последнем случае перед просмотром поверхность агара обрабатывают 20 % раствором трихлоруксусной кислоты. Положительные результаты соответствуют обнаружению зон просветления в агаре вокруг лунок с культурой.

5.6.2.3. Тест на лецитиназу

Наличие или отсутствие лецитиназной активности определяют в жидкой желточной среде или на агаре Хоттингера, в который добавлен стерильно желток куриного яйца. В пробирки с 5 мл жидкой желточной среды (прилож. 1.5) засевают петлей суточную культуру и инкубируют в термостате при (36 ± 1) °С. Возбудитель сибирской язвы, как правило, в течение нескольких суток инкубирования не свертывает желток, в то время как представители спорообразующих сапрофитов свертывают желток уже в первые сутки. На плотной питательной среде вокруг колоний сибиреязвенного микроба не формируются зоны ферментации желтка, в то время как вокруг колоний большинства сапрофитов, вырабатывающих активную лецитиназу, просматривается широкая беловатая непрозрачная зона.

5.6.2.4. Определение способности к росту на минимальной питательной среде

Для этого готовят минимальную питательную среду «9 АТ» (приложение 1.6). Споры изучаемых штаммов засевают на среду «9АТ» и выращивают в течение 24—48 ч при температуре (36 ± 1) °С. Для контроля засевают на эту среду споры *B. anthracis* 81/1. Если исследуемые штаммы не растут на этой среде через 48 ч, то их можно считать нуждающимися в дополнительных факторах роста.

5.6.2.5. Дифференциация культур сибиреязвенного микроба по вирулентности in vitro

Предлагаемый метод дифференциации культур сибиреязвенного микроба по вирулентности in vitro основан на объективной регистрации различий в продукции разными культурами капсулы и экзотоксина при культивировании на агаре Хоттингера в воздушной атмосфере и на среде «СОПЭК» (прилож. 1.7) в атмосфере, обогащенной CO_2. Капсулообразование регистрируется по характерному росту на плотных средах в виде гладких слизистых колоний, в мазках из которых при микроскопии обнаруживаются капсульные бациллы. Учет токсинообразования ведется по визуально наблюдаемым концентрическим ореолам иммунопреципитации в среде вокруг колоний, продуцирующих токсин. Иммунопреципитация в данном методе является следствием взаимодействия антитоксических антител противосибиреязвенного глобулина, введенного в состав среды, и диффундирующих в среду компонентов токсина, который синтезируется сибиреязвенным микробом при культивировании на среде в атмосфере с повышенным содержанием CO_2. Все это позволяет дифференцировать культуры с обычной, то есть CO_2-зависимой, CO_2-независимой продукцией капсулы,

бескапсульные, продуцирующие и не продуцирующие токсин. Среди них выделяют пять групп, в зависимости от характера экспрессии капсулы и токсина, которым соответствуют следующие степени патогенности: высоковирулентные, умеренно вирулентные, слабовирулентные, авирулентные и апатогенные.

Для исследования готовят суспензию спор или вегетативных клеток из суточных агаровых культур по ОСО мутности 10 ед. ГИСК им. Л. А. Тарасевича. Взвесь наносят петлей бляшками диаметром 3—4 мм от 10 до 50 инокулятов параллельно на одну чашку со средой СОПЭК и одну чашку с агаром Хоттингера. Для контроля качества среды засевают культуру типичного по капсуло- и токсинообразованию тест-штамма 81/1, любого бесплазмидного штамма, а также штамма с CO_2-независимой продукцией капсулы.

Чашки со средой «СОПЭК» помещают в микроанаэростат или CO_2-инкубатор. Из микроанаэростата вакуумным насосом откачивают 25 % воздуха, ориентируясь на показания мановакуумметра, и замещают его углекислым газом из баллона. В CO_2-инкубаторе чашки культивируют с 10 % углекислого газа. Посевы на среде «СОПЭК» выращивают при температуре (36 ± 1) °С в течение 48 ч, затем переносят чашки из микроанаэростата или CO_2-инкубатора в холодильник и выдерживают в течение 1—3 сут. при 4—0 °С. Чашки с агаром Хоттингера инкубируют при (36 ± 1) °С в обычной воздушной атмосфере в течение 24 ч.

По окончании указанных сроков инкубации (24 ч для агара Хоттингера и 48 ч для среды «СОПЭК») просматривают чашки, регистрируя морфологию колоний. Продуцирующие капсулу культуры формируют колонии в SM-форме – округлые, гладкие, блестящие, со слизистым капсульным веществом на поверхности. Не продуцирующие капсулу культуры растут в R-форме в виде шероховатых, с волокнистым краем матовых колоний.

Для подтверждения факта образования капсулы из колоний делают мазки для микроскопии, которые окрашивают раствором Ребигера в течение 15—20 с, промывают и высушивают. Капсула окрашивается в розовый цвет или остается неокрашенной, бактерии – в темно-фиолетовый.

По истечении 48 ч после начала инкубации чашки со средой «СОПЭК» просматривают при естественном освещении на черном фоне и отмечают предварительные результаты, пользуясь для этого листом черной бумаги. Вокруг колоний продуцирующих токсин в среде формируются концентрические ореолы иммунопреципитации в виде белых тонких колец. Колонии не продуцирующие токсин лишены таких ореолов. После выдерживания посевов на среде «СОПЭК» в холодильнике в течение 1—3 сут. их просматривают повторно и проводят окончательный учет результатов.

Интерпретация результатов

Культуры относят к высоко-вирулентным, если они продуцируют капсулу и токсин в атмосфере CO_2 и не продуцируют капсулу на воздухе; умеренно вирулентным, если они не продуцируют токсин, продуцируют капсулу в атмосфере CO_2 и не продуцируют ее на воздухе; слабовирулентным, если они не продуцируют токсин и продуцируют капсулу в атмосфере CO_2 и на воздухе; авирулентным, если они продуцируют токсин, но не продуцируют капсулу; апатогенным, если они не продуцируют ни капсулу, ни токсин.

5.6.2.6. Определение вирулентности выделенных культур in vivo

Вирулентность выделенных культур сибиреязвенного микроба определяют двумя методами: вычислением DCL или LD_{50}. Для заражения животных используют споровую взвесь, которую готовят следующим образом. Сибиреязвенную культуру отсевают на специальные питательные среды для образования спор: агар Гладстона, голодный пшеничный или гороховый агар и инкубируют в течение 1 сут. при (36 ± 1) °С, а затем в течение 4—6 сут. при (34 ± 1) °С. Споры *B. anthracis* можно получить также высевом на агар Хоттингера, содержащий 60 % аминного азота (pH – 7,2) в течение 4 сут. при 37 °С. Процесс спорообразования контролируют просмотром мазков, окрашенных по Ребигеру. При наличии 95—100 % спор культуру смывают дистиллированной водой и суспензию помещают на 2—3 сут. в холодильник для лизиса оставшихся вегетативных палочек. Для определения концентрации спор готовят десятикратные разведения полученной взвеси с использованием в качестве разводящей жидкости 0,10—0,05 % раствор Твина-80 на дистиллированной воде и делают высев в объеме 0,1 мл из пробирок с разведениями 10^{-6} и 10^{-7} на 3 чашки (каждое разведение) с агаром Хоттингера. Посевы инкубируют при (36 ± 1) °С в течение 18—20 ч. На следующий день подсчитывают выросшие колонии и соответственно вычисляют концентрацию спор в исходной взвеси, затем готовят для заражения соответствующие разведения на 0,9 % растворе хлорида натрия.

Для определения LD_{50} чаще всего используют белых беспородных мышей весом 18—20 г. Споровые взвеси, содержащие 1, 10, 100, 1 000 и 10 000 спор, вводят подкожно в объеме 0,5 мл, используя 4—6 животных на каждую дозу. За зараженными животными наблюдают в течение 10 сут., отмечают в каждой группе павших от сибиреязвенной инфекции животных. Статистическую обработку полученных результатов проводят по методу Рида и Менча или Кербера.

Для определения DCL используют морских свинок, кроликов и три заражающие дозы – 100, 1 000 и 10 000 спор. Каждой дозой

инфицируют не менее трех животных. Наблюдение за ними проводят до 10 суток. Из органов павших животных делают мазки-отпечатки для бактериоскопии и посевы на соответствующие питательные среды для установления специфичности гибели животных.

Культуры возбудителя сибирской язвы считаются вирулентными, если значение LD_{50} для белых мышей и морских свинок или DCL для кроликов не превышают 10 000 спор.

5.6.2.7. Идентификация штаммов сибиреязвенного микроба с атипичным капсулообразованием

Из всех выросших колоний, не изменивших своего цвета при обработке парами аммиака, как шероховатых (I, III тип), так и гладких слизистых (II тип), делают мазки и окрашивают их по Ребигеру или сибиреязвенными соматической, капсульно-соматической люминесцирующими сыворотками.

Для дальнейшего исследования отбирают колонии, в мазках из которых выявляются палочки, расположенные длинными цепочками с типичной морфологией. Палочки из колоний II типа могут быть окружены капсулой, окрашенной в розовый цвет при окраске по Ребигеру, или светиться на 3^+, 4^+ при окраске капсульносоматической люминесцирующей сывороткой. Из отобранных колоний делают пересевы в пробирки с МПБ и на чашки с 1 %-м бикарбонатно-сывороточным агаром. Последние выращивают при 5—50 % CO_2, как уже описано выше. Результаты учитывают через 24 ч инкубации при (36 ± 1) °С. В бульоне отмечают придонный рост в виде «комочка ваты» с сохранением прозрачности над ним, характерный для штаммов I и III типа. Штаммы II типа вызывают диффузное помутнение среды. На 1 %-м бикарбонатно-сывороточном агаре штаммы I и II типа растут в SM-форме в виде крупных слизистых колоний. Из колоний делают мазки с последующей их окраской на наличие капсулы. В мазках обнаруживают палочки, окруженные капсулой. Штаммы III типа растут на этой среде в R-форме, капсула в мазках не обнаруживается.

Из культур на 1 % бикарбонатно-сывороточном агаре готовят взвесь микробов в 0,9 %-м растворе натрия хлорида, которой заражают белых мышей подкожно в объеме 0,5 мл во внутреннюю поверхность бедра. Павших мышей вскрывают, отмечают характерную патологоанатомическую картину, делают мазки-отпечатки и высевы из органов и места введения. Выживших мышей забивают на 10 сут. и исследуют аналогично. В мазках-отпечатках от мышей, павших после заражения штаммами I и II типа, обнаруживаются капсульные клетки сибиреязвенного микроба и обильный рост микроба на питательных средах из всех органов и места введения. В мазках от мышей, зараженных штаммами III типа, клетки микроба наблюдаются редко, в основном из места введения, и они лишены

капсулы, а из органов и места введения вырастают единичные колонии в R-форме. В месте введения культур штаммов сибиреязвенного микроба I и III типов на 2—3 сут. развивается специфический студенистый геморрагический отек подкожной клетчатки, формирующийся под действием отечной фракции сибиреязвенного экзотоксина. Дальнейшая идентификация выделенных культур атипичных штаммов проводится по методам, описанным выше.

5.6.2.8. Определение MLVA-генотипа штаммов сибиреязвенного микроба

Определение MLVA-генотипа культур сибиреязвенного микроба целесообразно проводить по схеме и с использованием метода, описанного P. Keim et al. (2000). Такое генетическое типирование позволяет дифференцировать штаммы, установить их происхождение, осуществлять мониторинг в процессе эпидемиологического анализа вспышки. Исследование проводится в референс-лабораториях.

Временной график лабораторных исследований на сибирскую язву приведен в прилож. 8.

6. Выдача заключений по результатам лабораторного исследования на сибирскую язву

После проведения соответствующих этапов лабораторного исследования на сибирскую язву в определенные сроки можно давать следующие заключения о его результатах. В расчетные сроки не включено время, необходимое для подготовки проб (разбор проб и предварительная очистка, фильтрование, разведение или концентрирование материала, разделение на аликвоты).

6.1. Предварительные результаты специфической индикации

При исследовании патологического материала от людей и животных.

- через 2—6 ч, по результатам микроскопии и МФА с капсульно-соматической люминесцирующей сывороткой;
- через 8—12 ч, по результатам ПЦР;
- через 2—6 ч, по результатам реакции преципитации по Асколи.

При исследовании секционного материала от трупов людей и животных, а также кож, шкур, шерсти, мяса и мясопродуктов:

- через 2—6 ч, по результатам реакции преципитации по Асколи;
- через 2—6 ч, по результатам МФА с антиспоровой люминесцирующей сывороткой;
- через 8—12 ч, по результатам ПЦР.

При исследовании материала из объектов внешней среды:

- через 2—6 ч, по результатам МФА с антиспоровой люминесцирующей сывороткой;
- через 2—6 ч, по результатам РНГА;
- через 8—12 ч, по результатам ПЦР.

6.2. Окончательные результаты специфической индикации

При исследовании любого материала, подозрительного на зараженность возбудителем сибирской язвы, через 48 ч на основании результатов:

- ПЦР с материалом из типичных колоний;
- МФА при окраске люминесцирующей соматической сибиреязвенной сывороткой культуры из типичных колоний.

6.3. Окончательные результаты полного лабораторного анализа

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

- морфологии колоний на питательных средах, в том числе и дифференциально-диагностической, и характера роста в МПБ;
- морфологии в мазках из выросших подозрительных колоний, МПБ;
- патолого-анатомической картины у забитых на 2—3 сутки или павших белых мышей, обнаружения капсулы в мазках-отпечатках из органов биопробных животных и морфологии колоний при посеве органов на питательном агаре;
- характера роста колоний на 1 % бикарбонатно-сывороточном агаре и морфологии клеток в мазках, приготовленных из колоний или взвеси микробов, выросших на жидкой среде ГКИ;
- результатов теста с сибиреязвенным бактериофагом;
- результатов теста на щелочную фосфатазу;
- результатов теста на гемолиз на агаре с дефибринированной кровью барана;
- результатов теста на лецитиназу;
- результатов теста на подвижность;
- результатов теста «жемчужного ожерелья»;
- результатов аллергической реакции с антраксином (через 24 и 48 ч);
- результатов МФА (непрямой метод) с сывороткой больного.

6.4. Диагноз сибирской язвы

Диагноз сибирской язвы у человека считают установленным при наличии соответствующей клинической картины, эпидемио-

логического анамнеза, подтвержденных одним из нижеперечисленных способов:

• выделение из патологического материала культуры *B. anthracis*, гибель хотя бы одного зараженного лабораторного животного и выделение из его органов культуры со свойствами, характерными для возбудителя сибирской язвы;

• выделение вирулентной культуры *B. anthracis* из предполагаемого источника или фактора передачи;

• положительная антраксиновая проба.

Если по прошествию 72 ч положительные результаты не получены, окончательное отрицательное заключение может быть сделано не ранее 10 сут. после заражения биопробных животных (отрицательной биопробы).

6.5. Хранение штаммов B. anthracis

Сибиреязвенную культуру отсевают на специальные питательные среды для образования спор: МПА, агар Хоттингера с 60 % аминного азота (pH = 7,2), голодный пшеничный или гороховый агар и выращивают в термостате при температуре 37 °С в течение 4—7 суток. Процесс спорообразования контролируют просмотром мазков, окрашенных по Ребигеру. При наличии 95—100 % спор культуру смывают дистиллированной водой и отстаивают в условиях холодильника в течение 3 сут. для лизиса оставшихся вегетативных клеток. Затем надосадочную жидкость с помощью пипетки осторожно удаляют, а споры заключают в 30—50 %-й химически чистый глицерин. В запаянных ампулах в холодильнике обработанные таким образом споры могут длительно сохраняться в течение нескольких лет, не изменяя концентрации и своих биологических свойств.

7. Режим работы в лабораториях, работающих с возбудителем сибирской язвы

Все работы с возбудителем сибирской язвы должны проводиться в строгом соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП 1.3.1285—03 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)». Работы, связанные с высоким риском образования аэрозоля (центрифугирование, гомогенизация, измельчение, интенсивное встряхивание, вскрытие объектов с зараженным материалом и т. п.), проводят в отдельных боксовых помещениях или боксах биологической безопасности III класса.

Приложение 1

Питательные среды, применяемые для выделения и идентификации возбудителя сибирской язвы

1.1. Селективная дифференциально-диагностическая среда с натрия фенолфталеинфосфатом

В расплавленный питательный агар добавляют полимиксин сульфат М и триметоприм из расчета 25 мкг/мл, хорошо перемешивают. Перед розливом в чашки Петри в остуженную до 45—50 °С среду добавляют раствор натрия фенолфталеинфосфата, предварительно прогретого при 56 °С в течение 20 мин, до конечной концентрации 0,01 %. После перемешивания среду разливают в чашки Петри и подсушивают в течение 1,5 ч с открытыми крышками. Чашки с агаром можно хранить в холодильнике 2—3 суток.

1.2. Бикарбонатно-сывороточный агар 1 %-й

Предварительно готовят 10 % раствор $NaHCO_3$. Для этого 10 г пищевой соды растворяют в 100 мл стерильной дистиллированной воды при легком подогревании на пламени спиртовки. Затем в 100 мл расплавленного и остуженного до 50 °С агара Хоттингера добавляют 10 мл 10 %-го раствора соды, 10 %-й инактивированной при 56 °С в течение 30 мин лошадиной сыворотки. После розлива в чашки Петри и подсушивания агар можно использовать для посевов. Хранить агар не следует.

1.3. Среда ГКИ

Среда ГКИ состоит из 60 мл раствора Хенкса и 40 мл бычьей (лошадиной) сыворотки, инактивированной при 56 °С в течение 30 мин. Компоненты тщательно перемешивают, доводят бикарбонатом натрия pH до 7,2. Полученную среду стерильно разливают в пробирки по 2 мл и закрывают стерильными резиновыми пробками. Среда может храниться при 4 °С длительное время.

1.4. Кровяной агар

У барана из яремной вены кровь стерильно забирают в дефибринатор (флакон со стеклянными бусами) при постоянном его круговом покачивании. После окончательного формирования на бусах плотного сгустка фибрина (15—20 мин) кровь фильтруют через стерильную марлевую салфетку. Дефибринированную кровь добавляют в количестве 3—5 % в расплавленный и остуженный до 45 °С агар Хоттингера, который сразу же разливают в чашки Петри.

1.5. Жидкая желточная среда Дрожевкиной

Состоит из 1 части куриного желтка и 9 частей 0,9 %-го раствора хлорида натрия. Приготовление и розлив производят стерильно без последующей стерилизации. Помещают на 2 сут. при 37 °С для проверки на стерильность.

1.6. Минимальная среда «9АТ»

Для приготовления среды «9АТ» необходимы следующие ингредиенты (в г/л):

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	–	4,5
KH_2PO_4	–	0,5
$(NH_4)_2SO_4$	–	2,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	–	0,025
$MnSO_4 \cdot H_2O$	–	0,015
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	–	0,015
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	–	0,05
$C_6H_5O_7Na_3 \cdot 3H_2O$	–	0,5
d-глюкоза	–	4,0
l-аланин	–	0,02
l-гистидин	–	0,02
l-глутаминовая кислота	–	0,02
глицин	–	0,02
l-лизин	–	0,02
l-метионин	–	0,02
l-пролин	–	0,02
l-серин	–	0,02
l-треонин	–	0,02
тиамин	–	0,001
агар-агар «Дифко»	–	13
вода дистиллированная	–	до 1 л

1.7. Среда «СОПЭК»

Готовят среду путем растворения ингредиентов в 425 мл дистиллированной воды, в следующем соотношении (г):

l-аланин	–	0,035
l-аргинин HCl	–	0,200
l-аспарагиновая кислота	–	0,250
l-валин	–	0,240
l-гистидин HCl	–	0,074
глицин	–	0,090
l-глутамат натрия	–	0,820
l-изолейцин	–	0,230

1-лейцин	–	0,300
1-лизин	–	0,300
1-метионин	–	0,100
1-пролин	–	0,060
1-серин	–	0,310
1-треонин	–	0,160
1-тирозин	–	0,200
1-триптофан	–	0,047
1-фенилаланин	–	0,170
1- цистин	–	0,034
аденин	–	0,003
урацил	–	0,002
тиамин HCl	–	0,001
$CaCl_2$	–	0,008
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	–	0,026
$MnSO_4 \cdot H_2O$	–	0,002
$FeSO_4 \cdot H_2O$	–	0,002
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	–	3,920
$NaHCO_3$	–	8,0
d (+) глюкоза	–	2,5

Значение pH готовой среды составляет 8,0.

Полученный раствор питательной основы среды стерилизуется фильтрацией через мембранный фильтр. Навеску агарозы 15 г расплавляют в 500 мл дистиллированной воды и стерилизуют автоклавированием при 121 °С в течение 20 мин. К расплавленной и охлажденной до 50 °С агарозе стерильно добавляют подогретый до 50 °С раствор питательной основы в объеме 425 мл и противосибиреязвенный глобулин жидкий в объеме 75 мл, перемешивают и разливают в чашки Петри по 10—12 мл.

1.8. Транспортная среда № 1

1-й вариант: NaCl – 137 М, KCl – 2,7 М, NaH_2PO_4 – 10 М, K_2HPO_4 – 2 М, сыворотка крупного рогатого скота 20 %;

2-й вариант: сахароза – 0,218 М, KH_2PO_4 – 0,0038 М, K_2HPO_4 – 0,0072 М, БСА – 1 %.

1.9. Транспортная среда № 2 (ESP)

Саркозил – 1 %; ЭДТА – 0,05 М; свободная от нуклеаз проназа Е – 1 мг/мл.

Приложение 2

Приготовление рабочих растворов и реагентов

2.1. Фиксирующая жидкость для фиксации мазков

Фиксацию мазков проводят в соответствии с «Методическими рекомендациями по использованию этилового спирта с 3 % перекиси водорода для фиксации на предметном стекле возбудителя сибирской язвы» (М., 1984). Для приготовления фиксирующей жидкости с содержанием 3 %-го раствора перекиси водорода во флакон наливают 180 мл этилового спирта и 20 мл 30 %-го пергидроля. Содержание перекиси водорода в пергидроле необходимо определять по методике, изложенной в Государственной фармакопее СССР (М., 1968). Содержание перекиси водорода в рабочем растворе удобно проверять с применением полосок «ДЕЗИКОНТ-ПВ-01» индикаторных химических одноразовых для экспресс-контроля концентрации перекиси водорода в диапозоне 3—6 % фирмы ВИНАР или других фирм, производящих аналогичную продукцию. Фиксирующую жидкость можно не менять в течение месяца, при этом флакон должен закрываться притертой пробкой. Для хранения лучше использовать флакон из темного стекла. Флакон из обычного стекла необходимо держать в темном ящике (ящик лабораторного стола, холодильник). Приготовленные мазки из культур высушивают на воздухе, затем опускают во флакон с фиксирующей жидкостью. Через 30 мин стекла с мазками извлекают и просушивают на воздухе. Держать мазки более 30 мин в фиксирующей жидкости нежелательно. Можно хранить фиксированные мазки в закрытой чашке Петри в холодильнике.

2.2. Раствор Ребигера

Растворяют 15—20 г генцианвиолета в 100 мл 40 %-го формалина. Раствор выдерживают при комнатной температуре в течение нескольких часов, после чего фильтруют.

2.3. Карболовый фуксин Циля

Тщательно растирают в ступке 1 г основного фуксина и 5 г кристаллической карболовой кислоты с несколькими каплями глицерина. Во время растирания при постоянном помешивании понемногу приливают 10 мл 95°-го этилового спирта и 100 мл дистиллированной воды. Краска готова к употреблению через 2—3 дня после изготовления, сохраняется длительно.

Раствор Твина-80 2.4. 0,1—0,05 %-й и определение концентрации жизнеспособных спор

Определение концентрации жизнеспособных спор проводят в соответствии с методическими рекомендациями «Использование

0,05—0,10 %-го раствора Твина-80, как разводящей жидкости, для определения концентрации спор сибиреязвенного микроба» (М.,1986). 1—3 мл Твина-80 отливают в пробирку и греют на водяной бане при температуре 40—50 °С в течение 5—10 мин. Затем во флакон, содержащий 100 мл стерильной дистиллированной воды, добавляют 1 или 2 капли прогретого Твина-80 и содержимое тщательно перемешивают. Разводящая жидкость готова для употребления и может использоваться в течение 3—5 дней. В 7 пробирок вносят по 4,5 мл разводящей жидкости. Делают предварительные 10-кратные разведения споровой взвеси с переносом в пробирки по 0,5 мл с помощью мерных 1 мл пипеток. На каждое разведение используют новую пипетку. При перемешивании в разводящей жидкости не следует допускать образования больших пузырей, так как это может отразиться на точности подсчета. Из разведений 10^{-6} и 10^{-7} по 0,1 мл взвеси высевают на поверхность подсушенного агара Хоттингера. Для каждого разведения берут не менее 3 чашек. Суспензию распределяют по поверхности агара покачиванием чашек. После впитывания суспензии чашки выдерживают в термостате при 37 °С в течение 18—20 ч. Среднее значение количества выросших колоний, умноженное на 10 и на кратность разведения, составляет значение концентрации живых спор в исходной взвеси. Суспензию спор, приготовленную на Твине-80, не рекомендуется использовать для заражения или вакцинации животных. Для этих целей вновь готовят разведение спор на 0,9 %-м растворе хлорида натрия, исходя из концентрации жизнеспособных спор, установленных описанным способом.

2.5. Лизирующий буфер с гуанидинтиоцианатом (ЛБ)

На 50 мл: гуанидинтиоцианат – 35,4 г, тритон Х-100 – 1,3 г, 0,5 М раствор ЭДТА, pH 7,4 – 4,4 мл, 0,1 М раствор Трис-HCl, pH 6,4 – до 50 мл. С помощью 10 N раствора гидроокиси натрия pH готового раствора доводят до 7,4. Буфер хранят в полипропиленовой посуде при комнатной температуре до 3 мес., при 4—10 °С — до 6 мес.

2.6. Раствор для первой отмывки (ОР-1)

На 50 мл: гуанидинтиоцианат (4 М) – 23,6 г, 0,1 М раствор Трис-HCl – до 50 мл. Буфер хранят в полипропиленовой посуде при комнатной температуре до 3 мес., при 4—10 °С – до 6 мес.

2.7. Раствор для второй отмывки (ОР-2)

1 М раствор Трис-HCl, pH 8,5 – 1 мл, 5 М раствор натрия хлорида – 1 мл, спирт этиловый – 50 мл, дистиллированная вода – 50 мл. Буфер хранят в полипропиленовой посуде при комнатной температуре до 3 мес. при 4—10 °С – до 6 мес.

2.8. Суспензия сорбента (СС)

Готовят 50 % (вес/объем) суспензию силикагеля (SiO_2) с размером частиц 0,5—10 мкм в деионизованной воде.

2.9. Элюирующий буфер (ЭБ) ТЕ буфер pH 7,4

На 100 мл – 1 М раствор Трис-HCl, pH 8,0 – 1 мл, 0,5 М раствор ЭДТА – 0,2 мл, деионизованная вода – до 100 мл. Буфер хранят в полипропиленовой посуде при 4—10 °С – до 6 мес.

2.10. 0,5 М раствор ЭДТА, pH 8,0

Помещают 18,61 г соли в химический стакан на 100 мл, добавляют 80 мл дистиллированной воды, интенсивно размешивают на магнитной мешалке и доводят pH до 8,0 ± 0,1 с помощью натрия гидроокиси. Раствор хранят в темной полипропиленовой посуде при температуре (4 ± 2) °С до 3 мес.

2.11. 1 М раствор трис-HCl, pH 8,0 ± 0,1

Навеску трис-(оксиметил)-аминометана – 6,5 г помещают в химический стакан на 50 мл, добавляют 25 мл дистиллированной воды. После полного растворения соли доводят дистиллированной водой до 50 мл и выставляют pH 8,0 ± 0,1 с помощью концентрированной кислоты соляной. Раствор хранят при температуре (4 ± 2) °С до 3 мес.

2.12. 0,1 М раствор трис-HCl, pH 6,4 ± 0,1

Навеску трис-(оксиметил)-аминометана – 1,21 г помещают в химический стакан на 100 мл, добавляют 50 мл дистиллированной воды. После полного растворения соли доводят дистиллированной водой до 100 мл. Доводят pH до 6,4 ± 0,1 с помощью концентрированной соляной кислоты. Раствор хранят при температуре (4 ± 2) °С до 3 мес.

2.13. 5 М раствор натрия хлорида

Навеску натрия хлорида – 2,922 г помещают в химический стакан на 50 мл и добавляют 8 мл дистиллированной воды. Раствор хранят в стеклянной посуде при температуре (4 ± 2) °С до 3 мес.

2.14. 10 N раствор натрия гидроокиси

Навеску натрия гидроокиси – 40 г помещают в мерную колбу на 100 мл, добавляют 50 мл дистиллированной воды. После полного растворения натрия гидроксида доводят дистиллированной водой до 100 мл. Раствор хранят в непрозрачной полипропиленовой посуде при комнатной температуре до 6 мес.

Приложение 3

Критерии интерпретации результатов исследования *B. anthracis*: пограничные значения диаметров зон подавления роста (мм) и величин МПК (мг/л) антибактериальных препаратов

Анти-бактериальный препарат	Содержание препарата в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста, мм		Значение МПК, мг/л	
		S*	R*	S*	R*
Бензилпенициллин	10	≥ 26	≤ 16	≤ 0,1	≥ 1,0
Ампициллин	10	≥ 27	≤ 16	≤ 0,1	≥ 1,0
Цефазолин	30	≥ 29	≤ 16	≤ 0,2	≥1,0
Цефалексин	30	≥ 29	≤ 16	≤ 1,0	≥ 4,0
Эритромицин	15	≥ 24	≤ 16	≤ 1,0	≥ 4,0
Азитромицин	30	≥ 24	≤ 16	≤ 1,0	≥ 4,0
Линкомицин	15	≥ 23	≤ 16	≤ 1,0	≥ 4,0
Канамицин	10	≥ 19	≤ 16	≤ 1,0	≥ 4,0
Гентамицин	10	≥ 23	≤ 16	≤ 1,0	≥ 4,0
Стрептомицин	10	≥ 18	≤ 16	≤ 1,0	≥ 4,0
Амикацин	30	≥ 23	≤ 16	≤ 1,0	≥ 4,0
Тетрациклин	30	≥ 23	≤ 16	< 0,1	≥ 1,0
Доксициклин	10	≥ 23	≤ 16	< 0,1	≥ 1,0
Рифампицин	5	≥ 20	≤ 13	≤ 0,1	≥ 1,0
Ципрофлоксацин	5	≥ 17	≤ 15	< 0,1	≥ 1,0
Офлоксацин	5	≥ 19	≤ 15	< 0,1	≥ 1,0
Пефлоксацин	10	≥ 19	≤ 15	< 0,1	≥ 1,0
Ломефлоксацин	10	≥ 20	≤ 15	< 0,1	≥ 1,0
Меропенем	10	≥ 26	≤ 15	< 0,1	≥ 1,0
Имипенем	–	–	–	< 0,1	≥ 1,0

Примечание: S* – чувствительный, R* – устойчивый.

Приложение 4
(справочное)

Отличительные признаки
штаммов сибиреязвенного микроба различных типов

Признаки	Типы по Thorne		
	I	II	III
1	2	3	4
Морфология колоний			
На агаре Хоттингера при выращивании на воздухе	R-форма	SM-форма	R-форма
На 1 %-м бикарбонатно-сывороточном агаре в атмосфере с 10—50 % CO_2	SM-форма	SM-форма	R-форма
Капсулообразование			
На агаре Хоттингера при выращивании на воздухе	Отсутствует	Происходит	Отсутствует
На 1 %-м бикарбонатно-сывороточном агаре в атмосфере с 10—50 % CO_2	Происходит	Происходит	Отсутствует
В организме животных	Происходит	Происходит	Отсутствует
Рост в бульоне Хоттингера	Бульон прозрачный, придонный рост в виде «комочка ваты»	Бульон мутноватый, придонный рост в виде «комочка ваты»	Бульон прозрачный, придонный рост в виде «комочка ваты»

Продолжение прилож. 4

1	2	3	4
Вирулентность			
Для белых мышей	При заражении дозами $1—10^4$ спор вызывает гибель на 1—5 сут.	При заражении дозами $1—10^4$ спор вызывает гибель на 1—5 сут.	Вызывает гибель на 1—10 сут. в дозах $\geq 10^4$ спор, в меньших дозах – отек подкожной клетчатки в месте введения на 2—3 сут.
Для морских свинок	При заражении дозами $1—10^4$ спор вызывает гибель на 1—5 сут.	При заражении дозами $1—10^4$ спор вызывает гибель на 1—5 сут.	Вызывает гибель единичных особей от доз свыше 10^4 спор, в меньших дозах – отек подкожной клетчатки в месте введения на 2—3 сут.
Для кроликов	При заражении дозами $1—10^4$ спор вызывает гибель на 1—5 сут.	Не вызывает гибели при заражении дозами до 10^6 спор	Не вызывает гибели при заражении дозами до 10^6 спор

Приложение 5
(справочное)

Диагностические препараты,
применяемые для индикации и идентификации возбудителя
сибирской язвы

В целях индикации и идентификации возбудителя сибирской язвы могут быть использованы диагностические препараты перечисленных ниже или других фирм, производящих аналогичную продукцию.

№ п/п	Наименование препарата	Техническая документация	Производитель
1	2	3	4
1	Глобулин противосибиреязвенный лошадиный жидкий	ФС 42-3770—99 (до 21.07.04) РП т. 1 № 739—98 т. 2 № 740—98	Киров НИИМ МО РФ
2	Диагностикум эритроцитарный сибиреязвенный иммуноглобулиновый	ФСП 42-0095-1128—01 (от 16.05.01) РП № 101 8—00	Киров НИИМ МО РФ Екатеринбург ЦВТБ БЗ
3	Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие сибиреязвенные неадсорбированные, сухие	ФС 42-3640-98 (до 2003 г.) РП № 247—97	Москва ИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи
4	Бактериофаг Fah-ВНИИВВиМ сибиреязвенный диагностический	ТУ 10-09-39—90	ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии, г. Покров, Владимирская обл.
5	Тест-система для выявления ДНК *B. antracis* pXO1+ методом ПЦР (ГенСиб)	ТУ 8895-007-01898109—07 РУ № ФСР 2007/00101 (от 25.05.07)	Саратов ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора

Продолжение приложе. 5

1	2	3	4
6	Набор для выделения ДНК	На регистрации в ГИСК им. Л. А. Тарасевича	Саратов ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора
7	Набор реагентов для выявления ДНК *Bacillus anthracis* в биологическом материале и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» «АмплиСенс *Bacillus anthracis*-FRT»	ТУ 9398-001-01897593—07 РУ № ФСР 2008/02417 (от 09.04.08)	Москва ФГУН «ЦНИИэпидемиологии» Роспотребнадзора
8	Комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала «ДНК-сорб-В»	Регистрационное удостоверение № ФС 01262006/4774—06 (от 17.11.06) ТУ 9398-003-01897593—06	Москва ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора
9	Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие сибиреязвенные адсорбированные сухие антиспоровые и соматические	Экспериментально-производственные серии, будут сертифицированы в ближайшее время	Ставрополь ФГУЗ СтавНИПЧИ Роспотребнадзора
10	Питательная среда для выделения и культивирования сибиреязвеного микроба, сухая	ТУ 9398-055-78095326—07, регламент ПР 78095326-17—06	Оболенск ФГУН «Научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Приложение 6
(справочное)

Устойчивость *B. anthracis* к физическим и химическим факторам

Возбудитель сибирской язвы в зависимости от биологической формы существования обладает различной устойчивостью к неблагоприятным факторам внешней среды. Микроб в вегетативной форме характеризуется обычной резистентностью, свойственной другим бактериям. Споры возбудителя отличаются исключительной устойчивостью. Они остаются жизнеспособными при воздействии низких температур – замораживание в жидком азоте (при минус 190 °С) не нарушает их жизнедеятельности. Споры выдерживают кипячение в воде до 30 мин, действие текучего пара – до 12 мин, сухого жара при температуре 120 °С – до 2 ч. Прямой солнечный свет убивает споры только через 4—20 суток. Этиловый спирт в концентрации 40, 70 и 96 % является ненадежным средством дезинфекции материала, содержащего споры. Режимы обеззараживания материала, содержащего споры сибиреязвенного микроба, представлены в санитарно-эпидемиологических правилах СП 1.3.1285—03 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)», а также в сборнике правил санитарных СП 3.1.084—96 и ветеринарных ВП 13.3.4.1100—96 «Профилактика и борьба с заразными болезнями, общими для человека и животных» (М., 1996). В качестве средств и методов дезинфекции, используемых при работе с возбудителем сибирской язвы, утверждены:

- активированный осветленный раствор хлорной или белильной термостойкой извести с концентрацией от 4 до 20 %;
- растворы перекиси водорода с концентрацией 3—10 %, в сочетании с 0,1—0,5 % моющего средства или 1 % муравьиной кислоты;
- хлорамин Б (1—4 %);
- кальция гипохлорит нейтральный (15 и 20 %);
- двуосновная соль гипохлорита кальция (4 %);
- ДП-2 (1,2 и 3 %);
- Клорсепт [1,5 % по активному хлору (АХ)];
- Тепсихлор (5 и 3,5 % по АХ активированный);
- Пресепт (1,68 % по АХ);
- ПВК (2, 3, 4 % по перекиси водорода);
- Велтолен (2,5 % при 50—55 °С);
- Велтодез (2,5 и 5 % при 50—55 °С);
- Велтолен-экстра (5 и 8 % при 50—55 °С);
- Септодор-форте (5 % при 50—55 °С, 10 %);

- Никадез (5 и 15 %);
- Гамма-Д (10 и 12 %);
- РИК-Д (8 %);
- формалин (20 и 40 %, 5 и 0,2 % с 0,5 % мыла);
- едкий натр (10 % при температуре 70 °С);
- кипячение в течение 60 мин (вода, 2 %-й раствор пищевой соды, 2 % раствор кальцинированной соды);
- обработка водяным насыщенным паром под давлением (автоклавирование) 0,20 МПА (2,0 кгс/см^2) в течение 90 мин;
- прокаливание;
- сжигание.

Приложение 7

Иллюстрации к методическим указаниям «Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы»

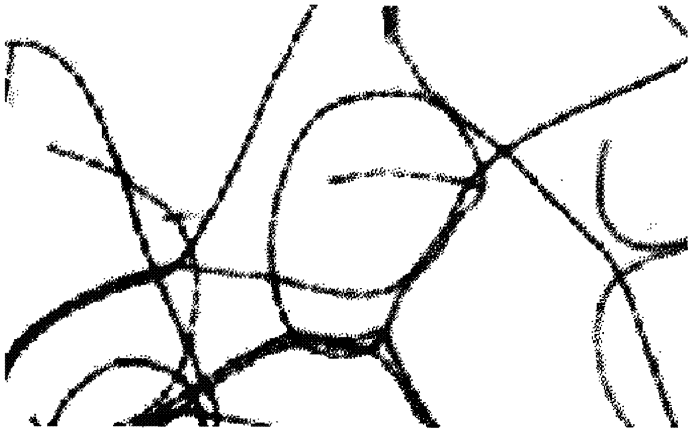


Рис. 1. Морфология *B. anthracis* в мазках с питательного агара – окраска по Граму

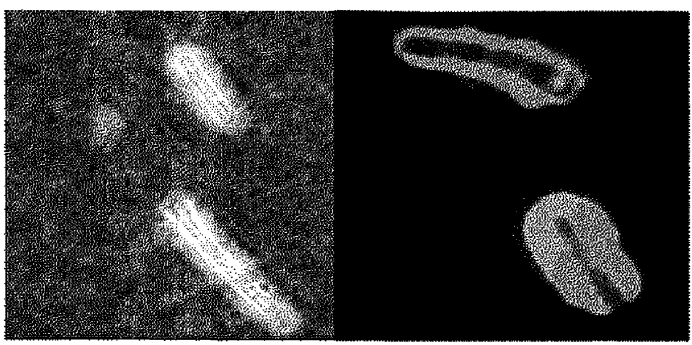


Рис. 2. Капсула *B. anthracis*. Окраска по Бури (А) и люминесцирующей капсульно-соматической сибиреязвенной сывороткой (Б)

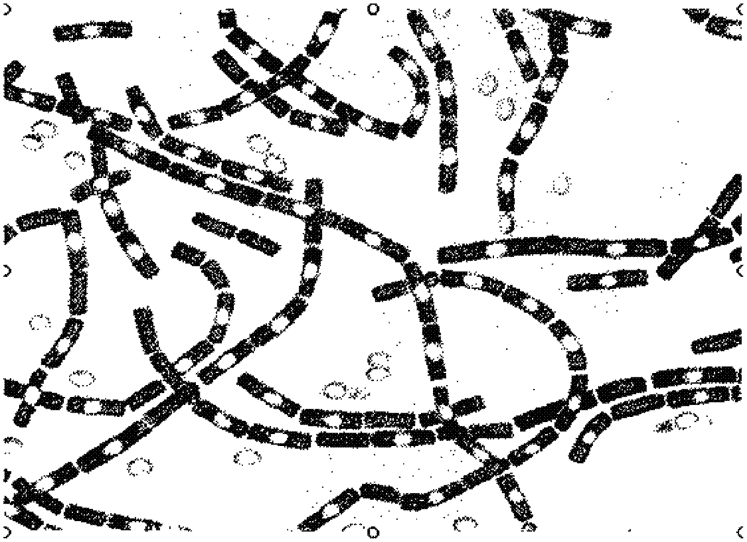


Рис. 3. Формирование спор *B. anthracis*

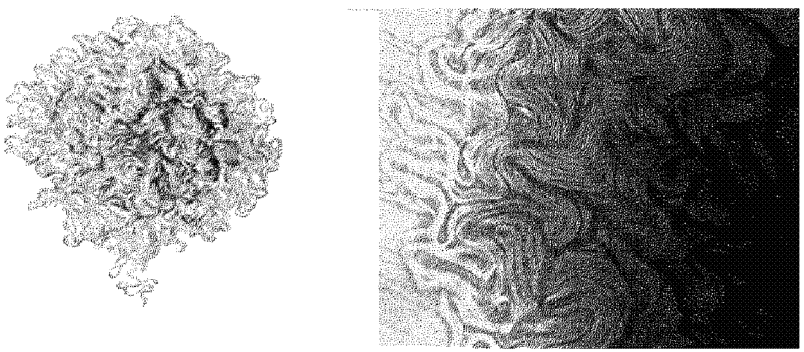


Рис. 4. Типичная колония *B. anthracis* на плотной питательной среде (а) и край колонии при малом увеличении (б)

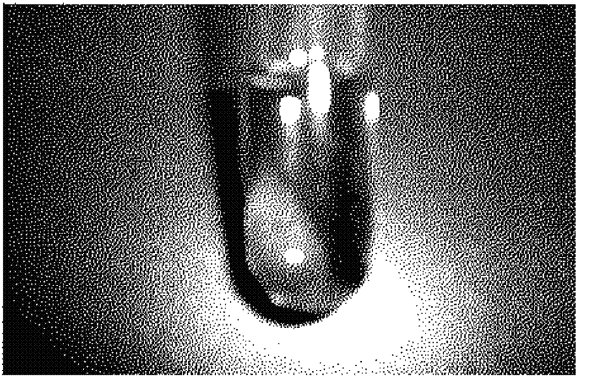


Рис. 5. Типичный рост *B. anthracis* в МПБ

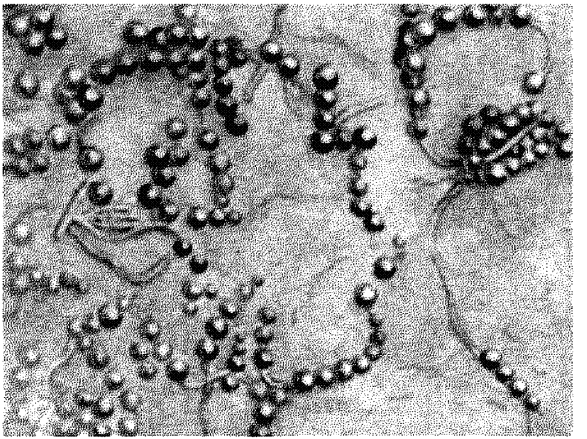


Рис. 6. Тест «жемчужное ожерелье»

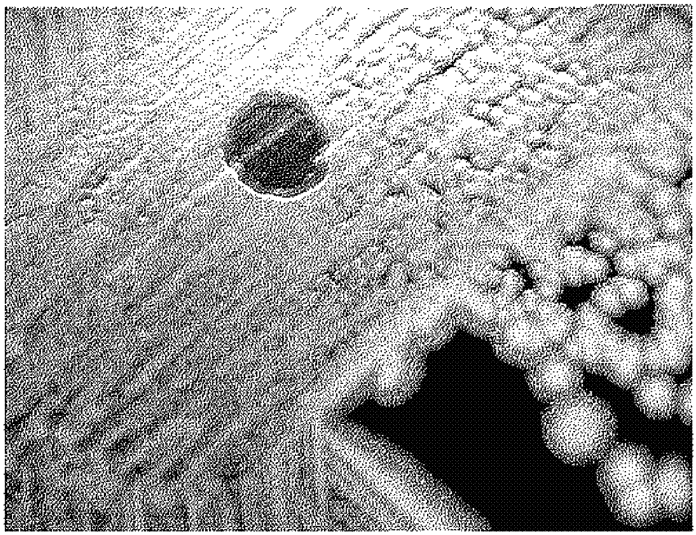


Рис. 7. Лизис *B. anthracis* бактериофагом «Гамма»

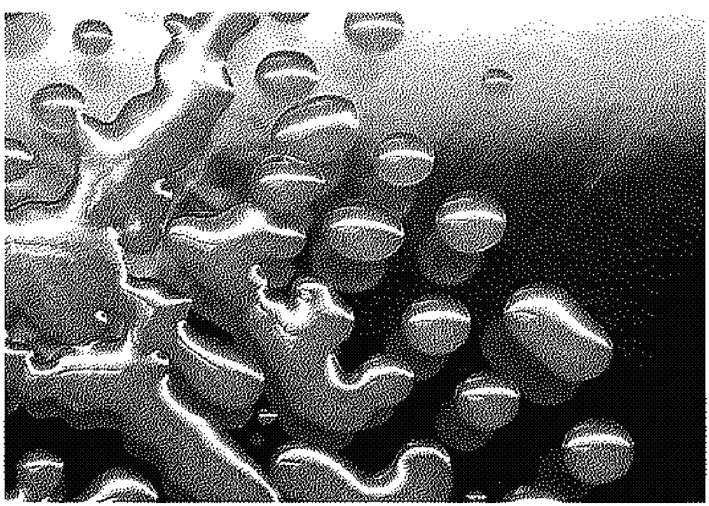


Рис. 8. Мукоидные колонии (SM-форма) *B. anthracis* на содовом агаре (10 % CO_2)

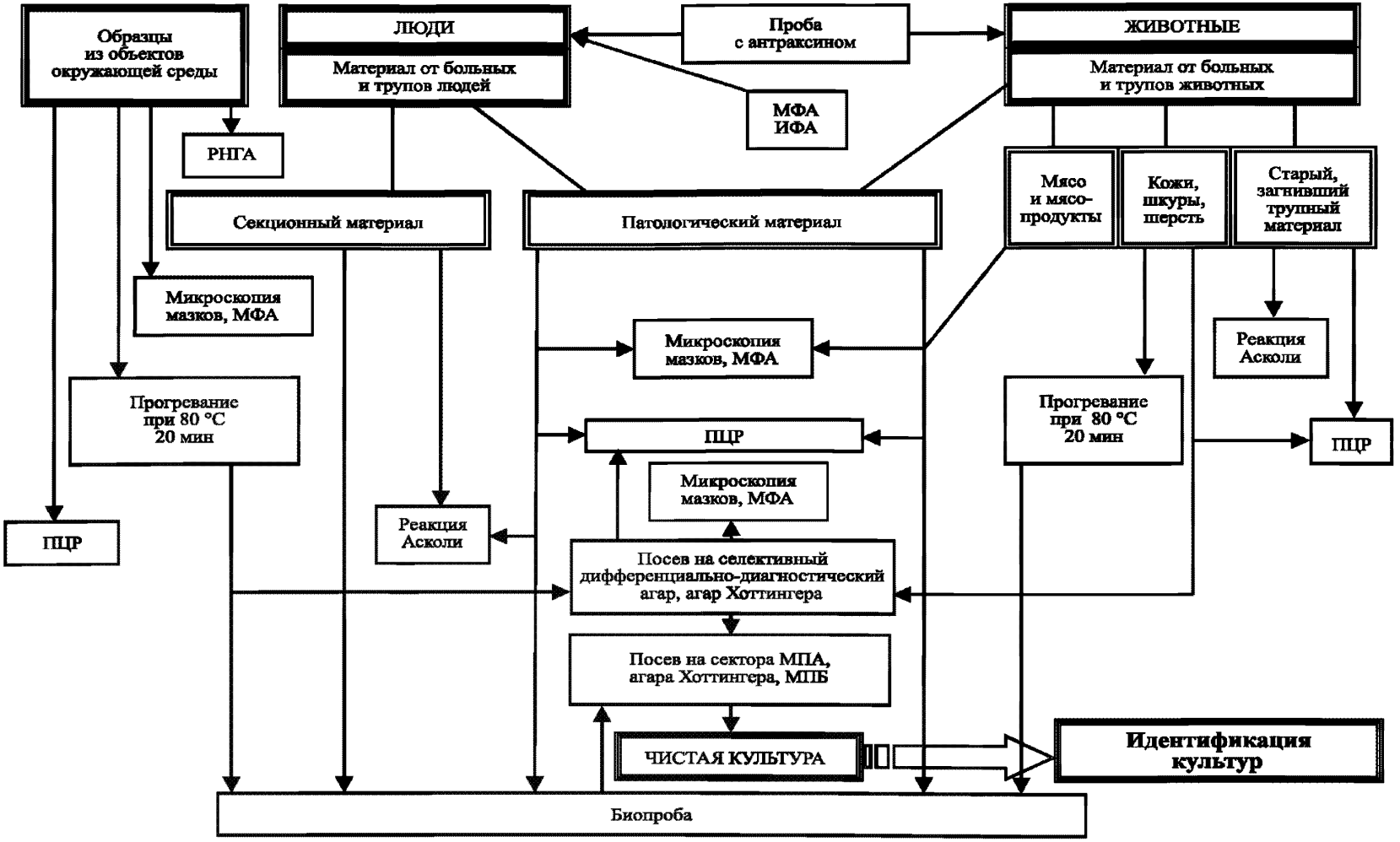


Рис. 9. Общая схема лабораторного исследования на сибирскую язву

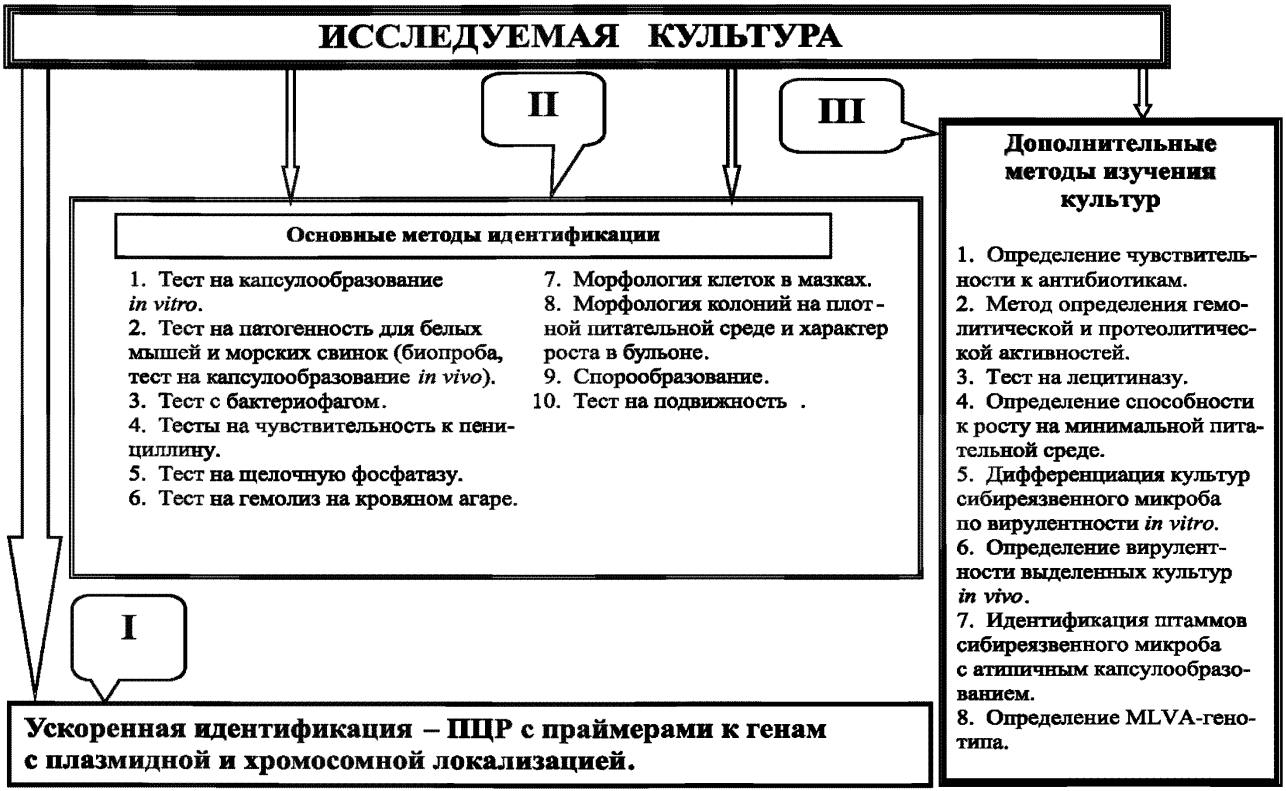


Рис. 10. Схема идентификации культур сибиреязвенного микроба

Приложение 8

Временной график
выполнения лабораторных исследований на сибирскую язву

1-й день

1. Подготовка материала для исследования.
2. ПЦР.
3. РНГА.
4. МФА.
5. Реакция преципитации по Асколи.
6. Посев материала на питательные среды.
7. Заражение биопробных животных.

2-й день

При наличии роста на питательных средах

1. Отбор колоний на плотных и оценка характера роста на жидких питательных средах, микроскопия мазков из культур.
2. Рассев отобранных культур с питательных сред до отдельных колоний на плотных неселективных питательных средах.
3. ПЦР
4. МФА } с материалом из колоний.

При наличии чистых культур
по результатам микроскопии и МФА

5. Отсев чистых культур из изолированных колоний на плотные неселективные питательные среды.
6. Постановка с материалом из чистых культур опорных идентификационных тестов (капсулообразование, на чувствительность к пенициллину, с бактериофагом, на щелочную фосфатазу, на гемолиз).
7. Наблюдение за биопробными животными, вскрытие павших, высевы на питательные среды и мазки-отпечатки из органов.
8. Микроскопия мазков от биопробных животных.

При отсутствии роста на питательных средах

Выполнение только пунктов 7 и 8.

3-й день

При наличии роста на питательных средах на второй день

1. Окончательный учет результатов опорных идентификационных тестов с чистой культурой.
2. Постановка остальных основных и дополнительных идентификационных тестов с чистой культурой.

3. Постановка с материалом из чистых культур опорных идентификационных тестов (капсулообразование, на чувствительность к пенициллину, с бактериофагом, на щелочную фосфатазу, на гемолиз).

4. При наличии чистой культуры и отсутствии павших животных заражение дополнительных животных материалом из бульонной или агаровой культуры.

При появлении роста на питательных средах только на третий день

1. Отбор колоний на плотных и оценка характера роста на жидких питательных средах, микроскопия мазков из культур.

2. Рассев отобранных культур с питательных сред до отдельных колоний на плотных неселективных питательных средах.

3. ПЦР
4. МФА } с материалом из колоний.

При наличии чистых культур по результатам микроскопии и МФА

5. Отсев чистых культур из изолированных колоний на плотные неселективные питательные среды.

6. Постановка с материалом из чистых культур опорных идентификационных тестов (капсулообразование, на чувствительность к пенициллину, с бактериофагом, на щелочную фосфатазу, на гемолиз).

Независимо от роста на питательных средах

7. Наблюдение за биопробными животными, вскрытие павших, высевы на питательные среды и мазки отпечатки из органов.

8. Микроскопия мазков от биопробных животных.

4—10-й день

Проведение исследований по графику 2—3 дней в зависимости от роста на питательных средах и результатов биопроб.

gost.e-ecolog.ru