

Микробиология сибирской язвы и иерсиниозов



ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ №9
Частная микробиология
Для студентов ОмГМА

Цель занятия:

- Ознакомить студентов с возбудителями особо опасных, природноочаговых антропозоонозных инфекций и современными методами их микробиологической диагностики.

• Микробиология иерсиниозов

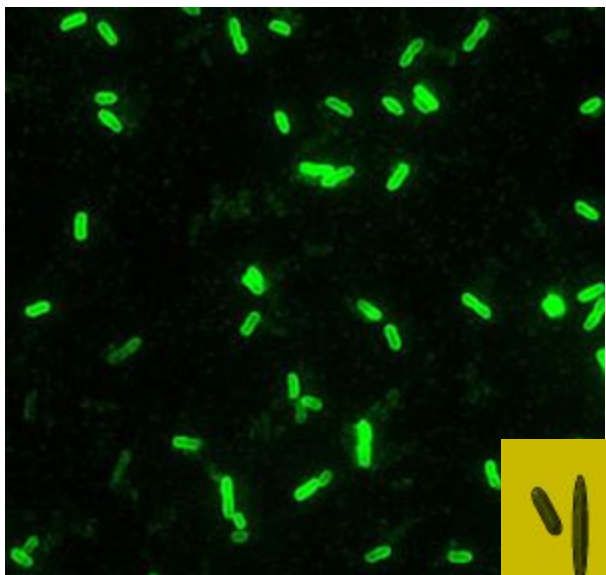
- Семейство Enterobacteriaceae
- Род Yersiniae
- Род включает 11 видов.

В патологии человека основное значение имеют 3 вида:

- *Y.pestis* - вызывает чуму,
- *Y.pseudotuberculosis* - псевдотуберкулез,
- *Y.enterocolitica* - (кишечный) иерсиниоз,

Ряд видов - непатогенные или условно – патогенные иерсинии для человека.

Иерсинии



• Чума

- **Чума (возбудитель *Y.pestis*) – острая инфекционная природноочаговая болезнь, относящаяся к группе карантинных (конвенционных) инфекций, характеризующаяся тяжёлой интоксикацией, лихорадкой, поражением кожи, лимфатических узлов лёгких, сепсисом и высокой летальностью.**

• Чума

- Возбудитель открыт в 1894г. А.Иерсеном совместно с С.Китасато.
- Известно 3 пандемии чумы:
 - Первая пандемия «юстинианова чума» - VI век (Ближний Восток, Европа) - вызвала гибель 100 млн человек;
 - Вторая пандемия «чёрная смерть» - XIV век (занесена в 1348 г. из Азии в Европу) - вызвала гибель более 50 млн. человек;
 - Третья пандемия – XIX век (началась в 1894 г. в Кантоне и Гонконге, охватывала только портовые города.

• Чума

- **Природные очаги чумы существуют на всех континентах кроме Австралии и Антарктиды.**
- **Регистрируются ежегодно до несколько сотен случаев**
- **В России очаги в регионах Закавказья, Поволжья.**

• Чума

- Резервуар возбудителя – дикие синантропные и домашние животные (около 300 видов)
- Основные носители – грызуны (сурки суслики, полёвки, крысы, зайцы и др.), у которых чума в зимней спячке протекает в хронической латентной форме.
- Они являются источником инфекции в межэпидемический период.
- Обнаруживается в географических зонах между 35⁰ северной широты и 35⁰ южной широты, где источники и хранители возбудителя – домовые виды крыс и мышей, от которых заражаются домашние животные.

• Чума

- Специфический переносчик возбудителя – блохи
- Человек в очагах заражается:
 - трансмиссивно – через укусы инфицированных блох;
 - контактным путём – при разделке шкур, мяса;
 - алиментарным путём – с заражёнными продуктами;
 - аэрогенным путём – от больных легочной формой.

Восприимчивость людей к чуме очень высока.

Индекс контагиозности приближается к единице.

• Морфология иерсиниозов

- Грамотрицательные палочки, чаще имеют овоидную (кокко-бациллярную) форму, склоны к полиморфизму.

- Окрашиваются анилиновыми красителями биполярно.

- Большинство видов иерсиний подвижны (имеют перитрихиальные жгутики) при температуре ниже +30 градусов С.

- *Y. pestis* – неподвижны при +30⁰ С, имеют капсульное вещество.

- Другие виды иерсиний имеют капсулу.



• **Культуральные и биохимические свойства иерсиниозов**

- **Факультативные анаэробы.**
- **Температурный оптимум от +25 до + 28 градусов С,**
- **pH - близкая к нейтральной.**
- **Хорошо культивируются на простых питательных средах.**
- **Ферментируют большинство углеводов без образования газа.**
- **Иерсинии способны менять свой метаболизм в зависимости от температуры и размножаться при низких температурах (*психрофильные свойства*).**
- **Вирулентные штаммы образуют шероховатые (R) колонии, переходные (RS) и сероватые слизистые гладкие (S) формы.**

Культуральные свойства *Y.pestis*



- **Культуральные и биохимические свойства *Y.pestis***

- Стадии роста *Y.pestis* на плотных питательных средах (СБТС, Туманского, Серова, Эндо, Мак-Конки, МПА):

I стадия «битого стекла» – через 8-12 часов

II стадия «кружевных платочков» - через 18-20 часов

III стадия «ромашки» - через 24 – 48 часов

- На жидких питательных средах (МПБ) образуют плёнку, от которой спускаются вниз нити «сталактиты», на дне – хлопьевидный осадок.

- **Антигенная структура и факторы патогенности *Y.pestis***

- ***Y.pestis* обладает антигенной структурой:**

O-Ag - термостабильный (имеют общие Ag с эритроцитами O - группы крови человека)

H-Ag - термолабильный

F1-Ag – протективный продуцируется при температуре 37 градусов, препятствует поглощению микроба фагоцитами, детерминируется –pFra-плазмидой

V-Ag (пептид) и **W-Ag** (внеклеточный полипротеин) обеспечивают способность бактерий сохраняться в фагоцитах

- Антигенная структура и факторы патогенности *Y.pestis*

- *Y.pestis* синтезирует ферменты:
 - Плазмокоагулазу
 - Фибринолизин
 - Гемолизин
 - Лецитиназу
 - РНК-зу
 - Пестицин

- Антигенная структура и факторы патогенности *Y.pestis*

- *Y.pestis* обладает тремя плазмидами:

pPst – детерминирует синтез фибринолизина и плазмокоагулазы

pCad - детерминирует синтез V-Ag и W-Ag

pFra – детерминирует синтез F1-Ag, препятствует поглощению микроба фагоцитами

• Биохимические свойства *Y.pestis*,

Необходимые для идентификации:

- Не разжижает желатин
- Не расщепляет мочевины
- Не ферментируют рамнозу и сахарозу
- Ферментирует декстрин
- По отношению к утилизации глицерина подразделяется на хемовары

• Клинические формы чумы

Зависят от пути заражения:

При контактном пути:

□ **1. КОЖНАЯ форма:**

- Первичная бубонная – заражение через кожу
- Генерализованная – при утрате лимфоузлом барьерной функции
- Вторичная бубонная форма

Гематогенный занос микробов в лёгкие может привести к

- **Вторично-легочной форме**



- Клинические формы чумы

При воздушно-капельном заражении:

□ 3. Первично-легочная форма

При алиментарном заражении:

□ 4. Кишечная форма



• Иммуни́тет (*Y.pestis*)

- Иммуни́тет различный по длительности и напряжённости. В основном клеточный (макрофагальный)
- Отмечаются повторные заражения

• Специфическая профилактика

- Применяется в очагах чумы. Используется живая ослабленная вакцина из штамма EV.
- Имеется сухая таблетированная вакцина для перорального применения.
- Для оценки иммунитета к чуме (естественного постинфекционного и вакцинального) может применяться **внутрикожная аллергическая проба с пестином.**

• Дифференциация иерсиниозов

Тест или субстрат	Y. pestis	Y. pseudo tuberculosis I-V	Y. enterocolitica (биовары)				
			I	II	III	IV	V
Глюкоза	+	+	+	+	+	+	+
Сахароза	-	-	+	+	+	+	+
Лактоза	-	-	-	+, -	-	-	-
Рамноза	-	+	-	-	-	-	-
Подвижность	-	+, - (28 C)	+	+	+	+	+
Подвижность	-	-	-	-	-	-	-
Уреаза	-	+	+	+	+	+	+
Декстрин	+	-	-	-	-	-	-
Эскулин	+	-	+, -	+, -	+, -	+, -	+
Лизиндекарбоксилаза	-	-	-	-	-	-	-
Орнитиндекарбоксилаз	-	-	+	+	+	+	+
Индол	-	-	+	+	-	-	-
Салицин	-	-, +	+	-	-	-	-
Ксилоза		+	+	+	+	-	-
Трегалоза		+	+	+	+	+	-
VP 28 градусов C	-	-	+	+	+	+	+
VP 37 градусов C	-	-	-	-	-	-	-
Гидролиз желатинны	-	-	-	-	-	-	-

• Псевдотуберкулёз

- Псевдотуберкулёз (*возбудитель - Y.pseudotuberculosis*) – инфекционное заболевание, характеризующееся полиморфностью клинической картины с поражением мезентериальных лимфоузлов, затяжным течением, аллергизацией организма с развитием ГЗТ.

• Псевдотуберкулёз

- **Возбудитель** - *Y.pseudotuberculosis* впервые описан в 1883г. Л.Маляссе и В. Виньялем.
- **Резервуар** возбудителя в природе – многие виды млекопитающих, птицы, грызуны, вода, почва.
- **Пути передачи** – водный, алиментарный
- **Факторы передачи** – вода и овощи.
- **Заражение человека от больного или носителя – не происходит.**

• Псевдотуберкулёз

- **Болезнь распространена повсеместно**
- **Возникает в виде спорадических и эпидемических вспышек**
- **Характерна сезонность: февраль – март.**
- **На Дальнем Востоке протекает в виде эпидемических вспышек в генерализованной форме под названием Дальневосточная скарлатиноподобная лихорадка.**

• Кишечный иерсиниоз

- Кишечный иерсиниоз (возбудитель - *Y. enterocolitica*) - инфекционное заболевание с поражением тонкого и толстого кишечника и развитием мезентериального лимфаденита



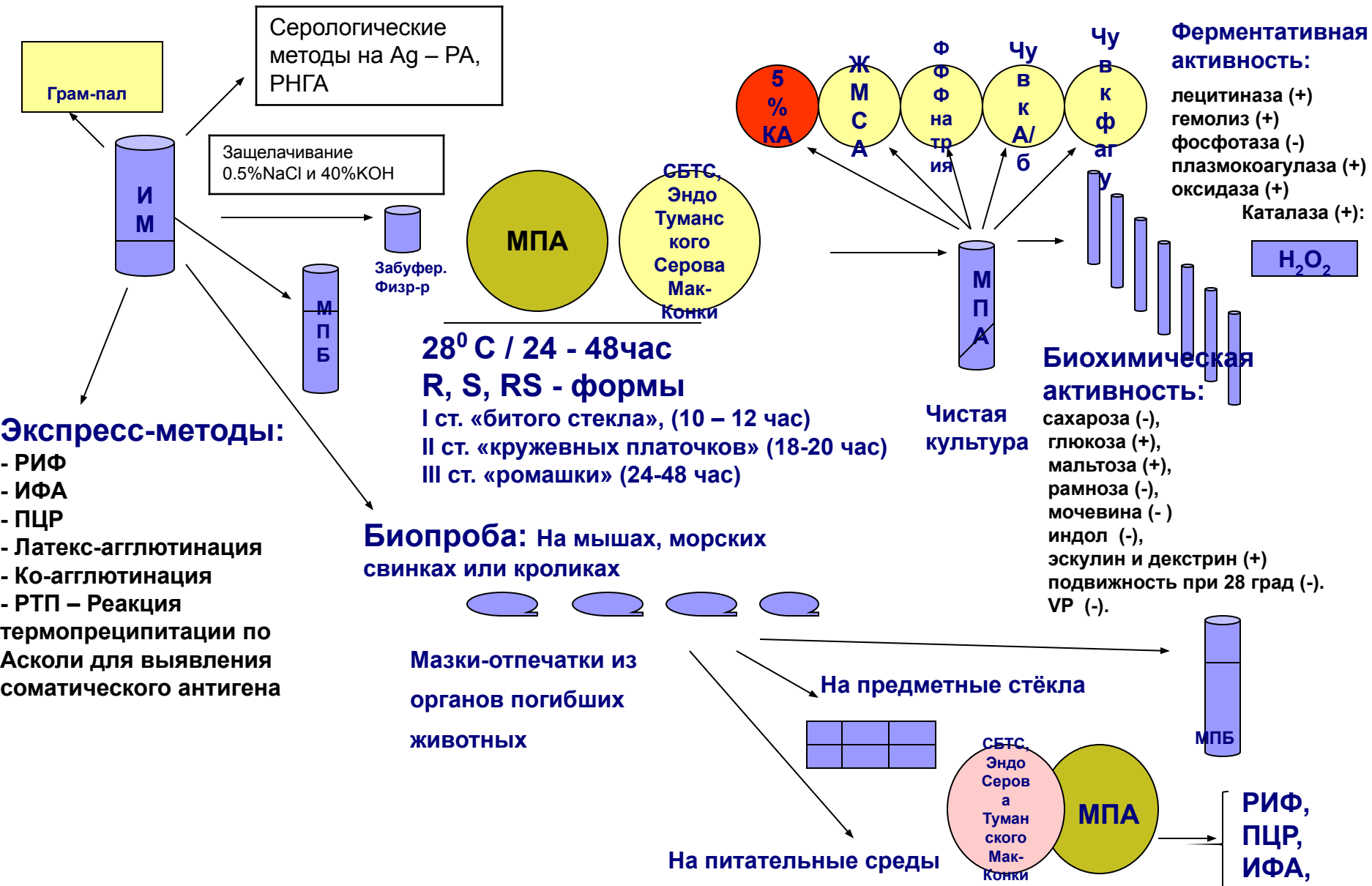
• Кишечный иерсиниоз

- **Возбудитель - *Y.enterocolitica***

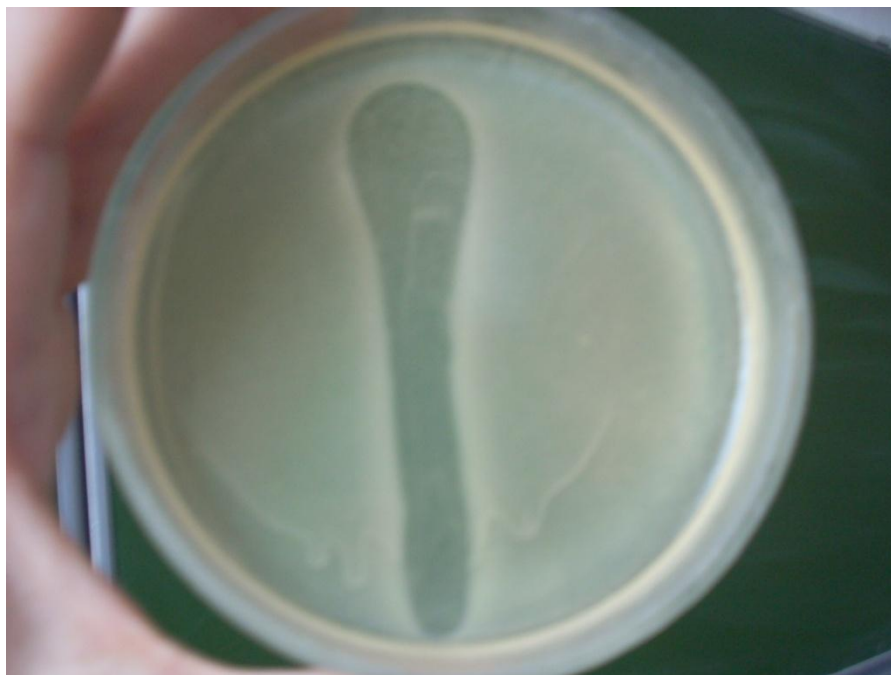
описан Дж. Шлейфстейном и М.Калеманом в 1939г.

- **Заболевание стало широко распространяться с конца 1960 годов**
- **Антропозооноз**
- **Выявляется во всех странах**
- **Возникает в виде групповых, семейных и внутрибольничных вспышек**
- **Резервуар в природе – почва, вода, растения.**
- **Резервуар и источник инфекции – домашние животные и птицы.**
- **Основные пути передачи – водный и алиментарный (через воду, молоко, овощи)**
- **Может передаваться от человека к человеку**

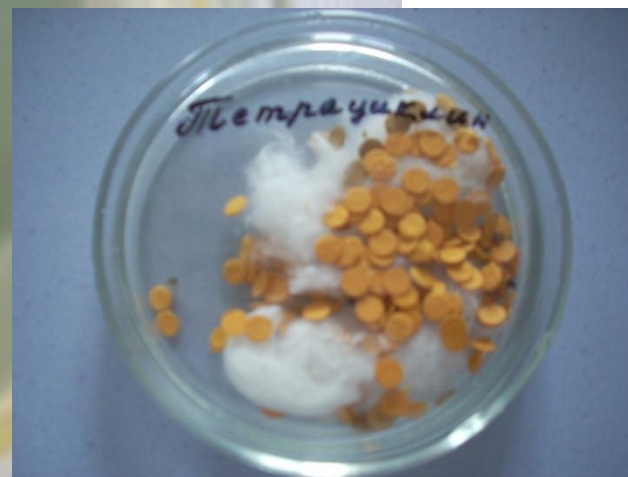
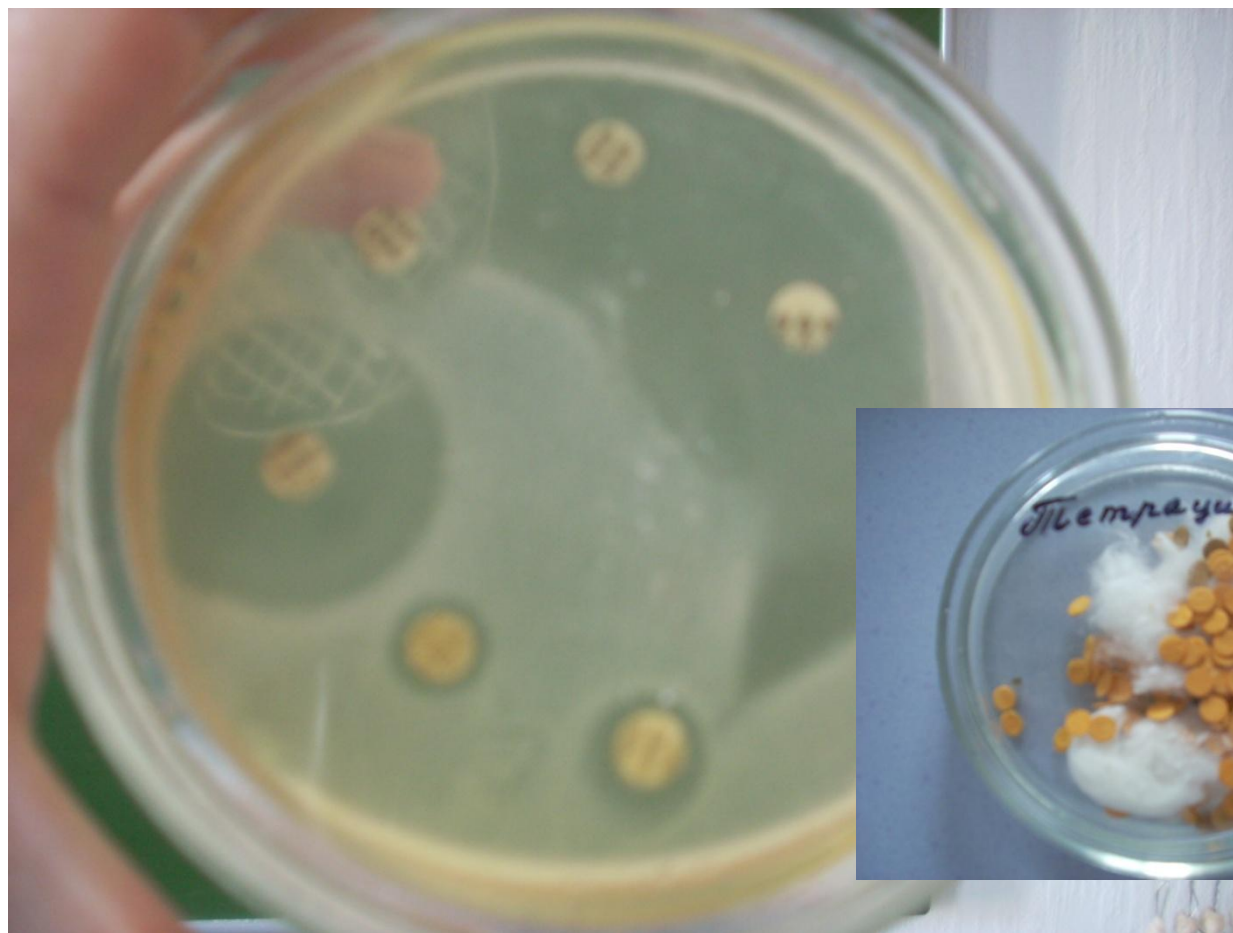
Лабораторная диагностика чумы



Определение чувствительности к чумному бактериофагу



Определение чувствительности к антибиотикам методом диффузии в агар с использованием ДИСКОВ

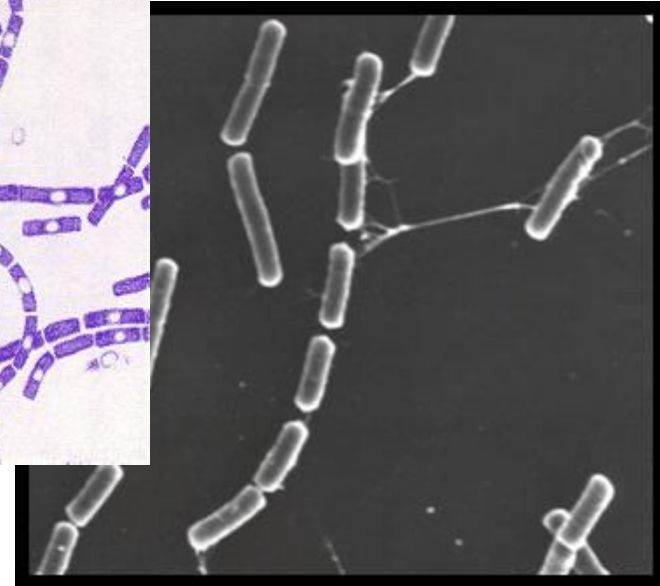
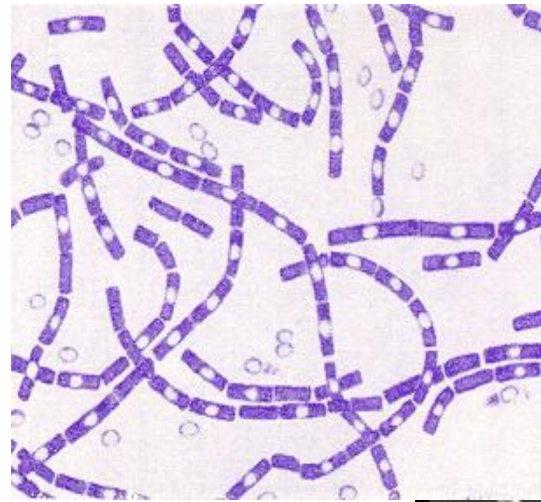


- **Сибирская язва.**



• Сибирская язва.

- Возбудитель сибирской язвы - *Bacillus anthracis*
- Семейство *Bacillaceae* (бациллы)
- Род *Bacillus*

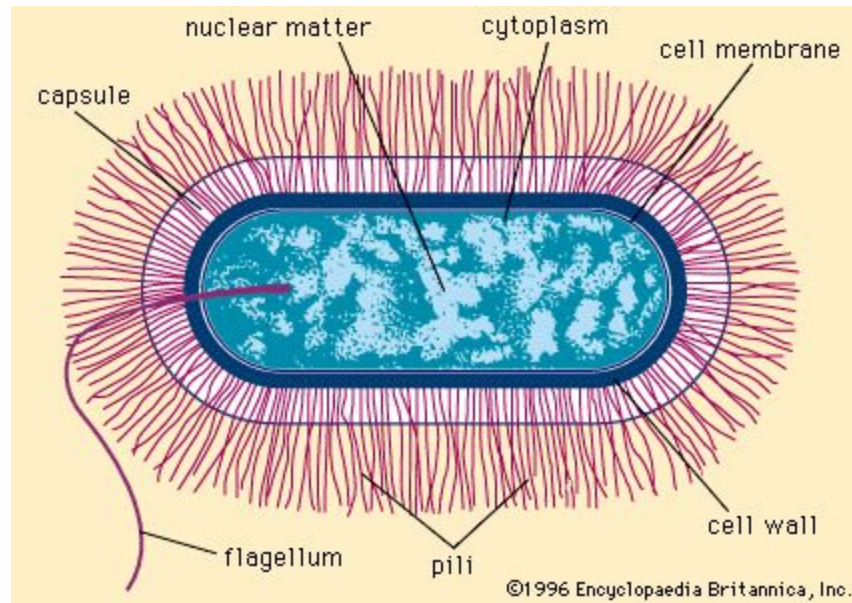


- **Сибирская язва.**

Морфология

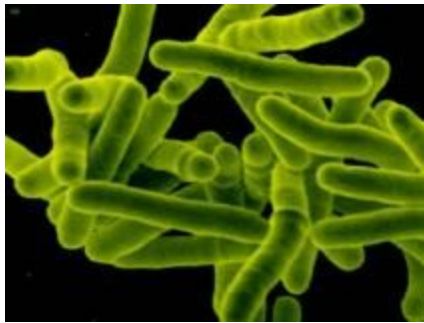
- **Крупная грамположительная палочка, с закругленными или чаще с обрубленными концами.**
- **На средах возбудитель образует длинные цепочки в виде “*бамбуковой трости*” (с утолщениями на концах и сочленениями клеток).**
- **В отличие от других бацилл – неподвижна**
- **Хорошо окрашивается анилиновыми красителями.**
- **В клинических материалах расположены парами или в виде коротких цепочек, окруженных общей капсулой**
- **Капсула образуется только в организме человека и животных или на специальных средах с кровью, сывороткой крови.**

Структура клетки бацилл





Спорообразование у
Bacillus anthracis

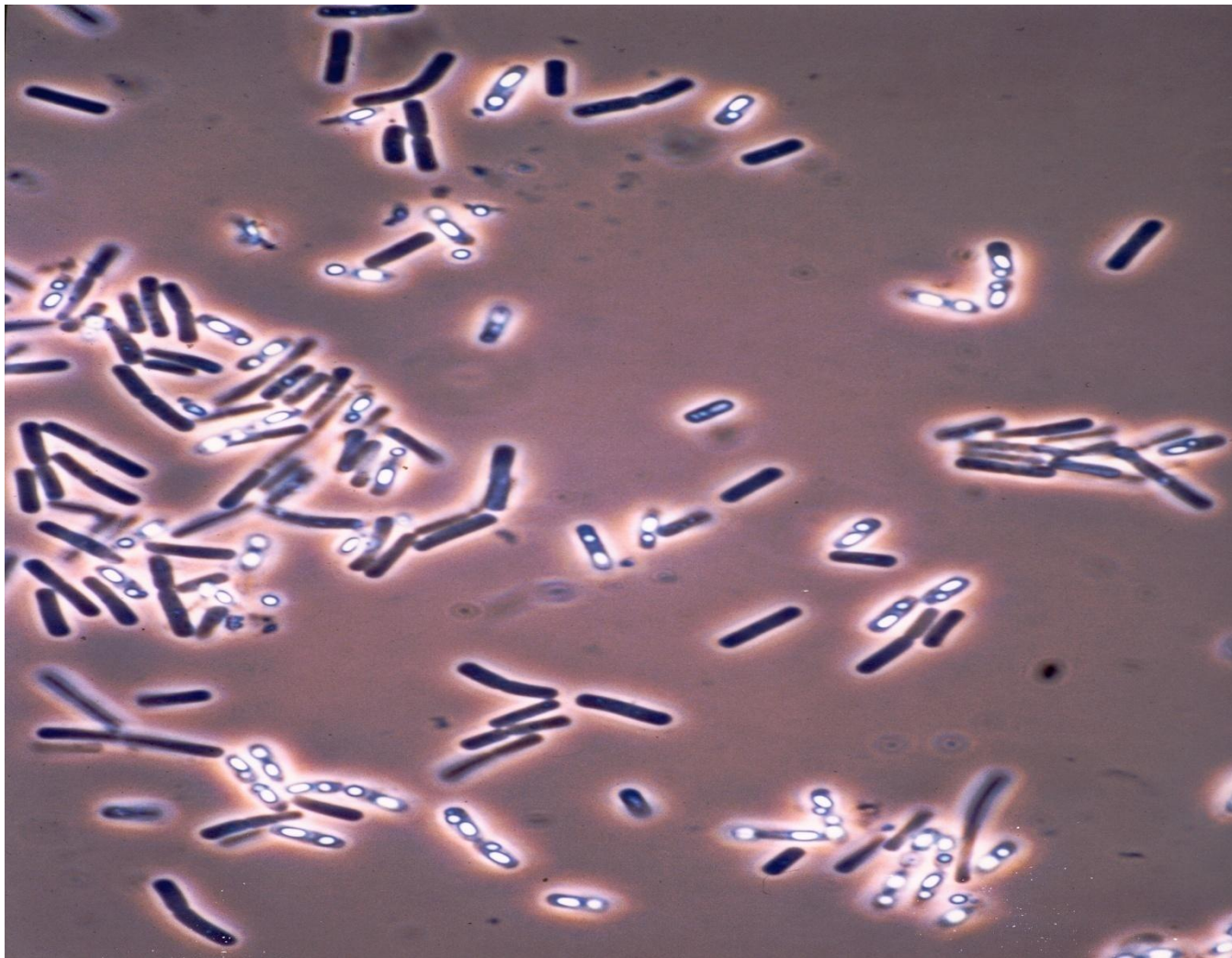


- Сибирская язва.

Морфология

- Возбудитель сибирской язвы образует эндоспоры, которые располагаются центрально, их диаметр не превышает диаметра бактериальной клетки.
- Споры образуются только вне организма, при наличии (доступе) кислорода и определенной температуре (от +12 до +43о С, оптимум при 30-35о С).
- Споры проявляют очень высокую устойчивость во внешней среде (десятилетия).
- Сибирская язва - почвенная инфекция.

Эндоспоры *Bacillus anthracis*

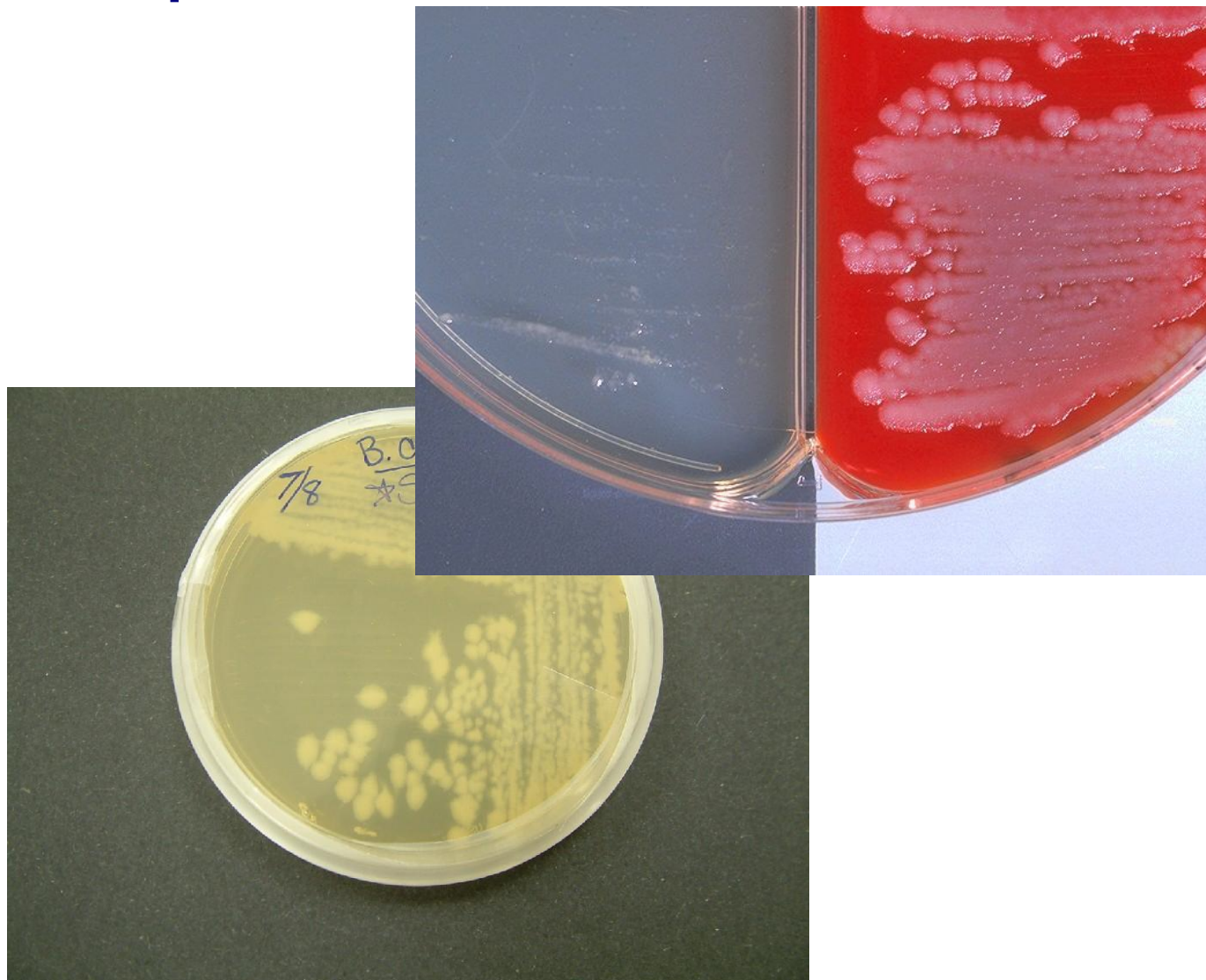


- **Сибирская язва.**

Культуральные свойства.

- **Возбудитель растет в аэробных и факультативно - анаэробных условиях.**
- **Температурный оптимум +37°C, рН - 7,2 - 7,6.**
- **Растет на простых питательных средах, в т.ч. на картофеле, настое соломы, экстрактах злаковых и др.**
- **Дает характерный рост при посеве уколом в желатин (*“перевернутая елочка”*).**
- **Вирулентные R- формы на плотных средах образуют шероховатые серовато - белые колонии волокнистой структуры (*“голова медузы”* или *“львиная грива”*).**
- **На средах образует длинные цепочки в виде *“бамбуковой трости”* (с утолщениями на концах и сочленениями клеток).**

Рост бацилл на МПА и 5% КА



- **Сибирская язва.**

Культуральные свойства.

- На агаре, содержащем пенициллин, происходит разрушение клеточных стенок, образуются шаровидные протопласты в виде цепочек (“жемчужное ожерелье”).
- На жидких средах образуется осадок в виде комочка ваты.
- Возбудитель сибирской язвы может образовывать также гладкие (S), слизистые (M) или смешанные (SM) колонии, особенно в микроаэрофильных условиях.
- В S - форме возбудитель утрачивает вирулентность.

- **Сибирская язва.**

Биохимические свойства

- ***B.anthraxis* биохимически высоко активна**
- **Ферментирует с образованием кислоты без газа глюкозу, сахарозу, мальтозу, трегалозу**
- **Образует сероводород**
- **Свертывает и пептонизирует молоко.**

- **Сибирская язва.**

Антигенная структура

- Выделяют три основных группы антигенов - капсульный антиген, соматические антигены, токсин (кодируются плазмидами, при их отсутствии штаммы авирулентны).
- **Капсульные антигены** отличаются по химической структуре от К - антигенов других бактерий, полипептидной природы, образуются преимущественно в организме хозяина.
- **Соматические антигены** - полисахариды клеточной стенки, термостабильны, долго сохраняются во внешней среде, трупах. Выявляют их в реакции термопреципитации Асколи.
- **Токсин** включает протективный антиген (индуцирует синтез защитных антител), летальный фактор, отечный фактор.

- Сибирская язва.

Факторы патогенности

- **- капсула и токсин.**

- **Сибирская язва.**

Эпидемиология

- **Сибирская язва - зоонозная инфекция.**
- **Основной источник для человека - травоядные животные.**
- **Животные заражаются происходит преимущественно алиментарным путем, споры длительно сохраняются в почве и заглатываются животными преимущественно с кормами, травой).**
- **Особую опасность представляют сибиреязвенные скотомогильники (в них споры длительно сохраняются, при их разрывании, размывании и других процессах попадают на поверхность почвы и растения).**
- **Человек заражается при контакте с инфицированным материалом (уход за больными животными, разделка и употребление в пищу инфицированных мясных продуктов, контакт со шкурами сибиреязвенных животных и др.).**

- **Сибирская язва.**

Клинического проявления

зависят от входных ворот инфекции:

- **кожная (карбункул),**
- **кишечная,**
- **легочная,**
- **септическая.**
- **Характерна высокая летальность (меньше при кожной форме).**

- **Сибирская язва.**

Лабораторная диагностика.

Материал для исследования от больных зависит от клинической формы.

- При кожной форме исследуют содержимое пузырьков, отделяемое карбункула или язвы,
- При кишечной - испражнения и мочу,
- При легочной - мокроту,
- При септической - кровь.
- Исследованию подлежат объекты внешней среды, материал от животных, пищевые продукты.

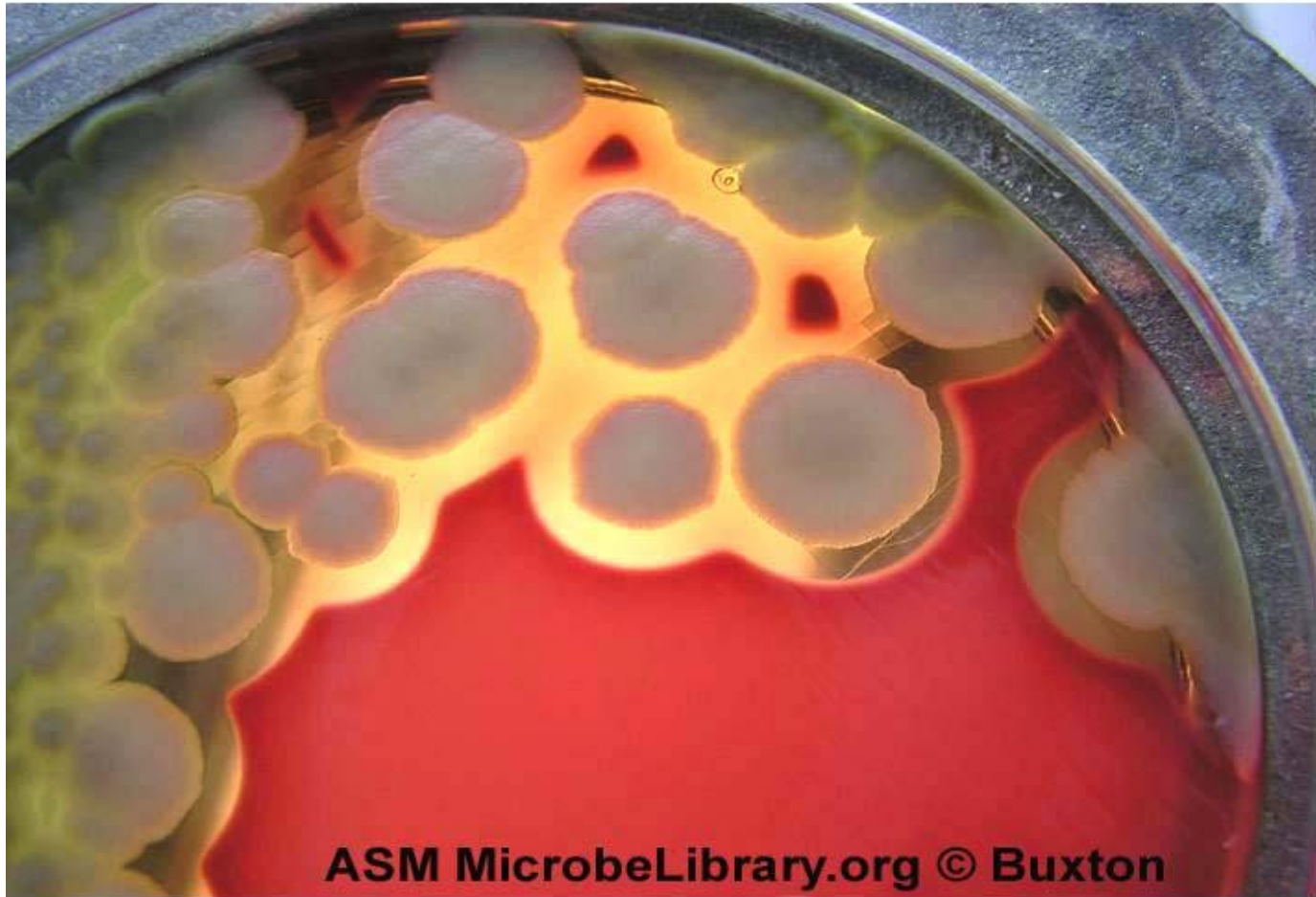
• Сибирская язва.

Лабораторная диагностика.

Бактериоскопический метод

- Окраска используется для обнаружения грамположительных палочек, окруженных капсулой, в материалах от человека и животных, спор - из объектов внешней среды:
 - по Граму (Грам+),
 - раствором Ребигера на капсулу (капсула красно-фиолетовая, тело – тёмно-фиолетовое),
 - по Пешкову (спора- голубая, клетка – розовая). Препарат фиксируют 15 мин в жидкости: 90% спирта 60мл+ хлораформа 30мл + уксусной эссенции 10 мл. Протравливают 2-5 мин в 10% водном растворе танина. Промывают водой, красят 30-60 сек фуксином Пфейффера и не промывая сушат и микровскопируют.
 - синькой Лёфлера (тело – синее, спора – розовая).
- Чаще применяют метод флюоресцирующих антител (МФА), позволяющий выявлять капсульные антигены и споры.

Po



ASM MicrobeLibrary.org © Buxton

- **Сибирская язва.**

**Лабораторная диагностика.
Бактериологический метод**

- В лабораториях особо опасных инфекций по стандартной схеме проводятся посевы на простые питательные среды: МПА, МПА с пенициллином (тест «жемчужное ожерелье»), дрожжевая среда, среда ГКИ.
- Определяется подвижность (-), образование капсулы возбудителя в чистой культуре.
- Определяется ферментативная активность:
каталазная (+),
лецитиназная (-),
гемолитическая (-),
фосфотазная (-).

- **Сибирская язва.**

**Лабораторная диагностика.
Бактериологический метод**

- **Изучается биохимическая активность на углеводах:
сахароза (+),
глюкоза (+),
мальтоза (+),
трегалоза (+),
желатин (+ «перевернутая ёлочка»).**
- **Образование сероводорода (+), KNO_3 (+).**
- **Определяется способность свёртывать и пептонизировать молоко (+).**
- **Определяют *лизабельность бактериофагами.***

• Сибирская язва.

Лабораторная диагностика.

Бактериологический метод

Определение капсулообразования

2 метода:

In vitro: В среду Хенкса с 40% бычьей или лошадиной сыворотки (предварительно активированной при 56° – 30 мин) добавляют несколько капель испытуемого материала.

- Закрывают пробкой и помещают на 30 мин до 120 мин в термостат на 37 градусов для капсулообразования у культуры.
- Из материала делают мазки, окрашивают люмсыыворотками для ИФМ (иммунофлюорисцентный метод).

In vivo: биопроба на мышах с последующим получением чистой капсульной культуры из органов.

- **Сибирская язва.**

Лабораторная диагностика.

Биологическая проба

- **Белые мыши погибают в пределах двух суток,**
- **Морские свинки и кролики погибают в течение четырех суток.**
- **Из органов погибших животных (лимфоузлы, селезёнка, печень, лёгкие, сердце, почки и из крови делают мазки-отпечатки.**
- **Мазки-отпечатки, обработанные смесью Никифорова окрашиваются:**
 - **по Граму,**
 - **по Романовского-Гимзе,**
 - **люмсыворотками или иммунными сыворотками для РИФ, люммикроскопии.**

- **Сибирская язва.**

Лабораторная диагностика.

Иммунологические и серологические методы

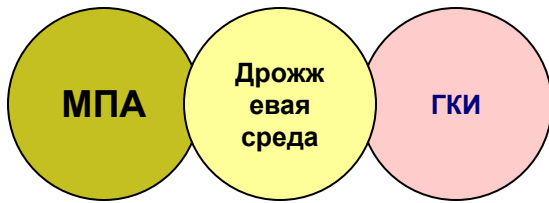
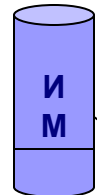
- **РИФ**
- **ИФА**
- **ПЦР**
- **Латекс-агглютинация**
- **Ко-агглютинация**
- **РТП – Реакция термореципитации по Асколи для выявления соматического антигена**
- **РНГА**

Лабораторная диагностика сибирской

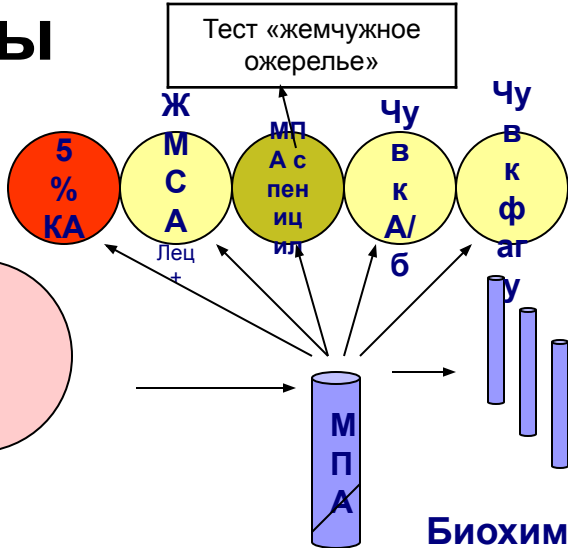
ЯЗВЫ



Серологические методы на Ag: РА, РНГА,



37° С / 24 - 48 час
R, S, M - формы
«Голова медузы»,
«Львиная грива» (10 – 12 час)



Ферментативная активность:
лецитиназа (+)
гемолиз (+)
фосфатаза (+)
плазмокоагулаза (+)
оксидаза (+)
каталаза (+):
 H_2O_2

Биохимическая активность:
сахароза (-),
глюкоза (+),
мальтоза (+),
крахмал (+),
фруктоза (+)
свёртывает молоко (+)
желатиназа (+)
сероводород (+), KNO_3 (+)

Чистая культура

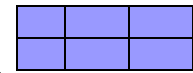
Экспресс-методы:
- РИФ
- ИФА
- ПЦР
- Латекс-агглютинация
- Ко-агглютинация
- РТП – Реакция термореципитации по Асколи для выявления соматического антигена

Биопроба: На мышях, морских свинках или кроликах

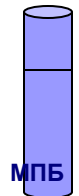


Мазки-отпечатки из органов погибших Животных, окраска по Романовского-Гимзе

На предметные стёкла



На питательные среды



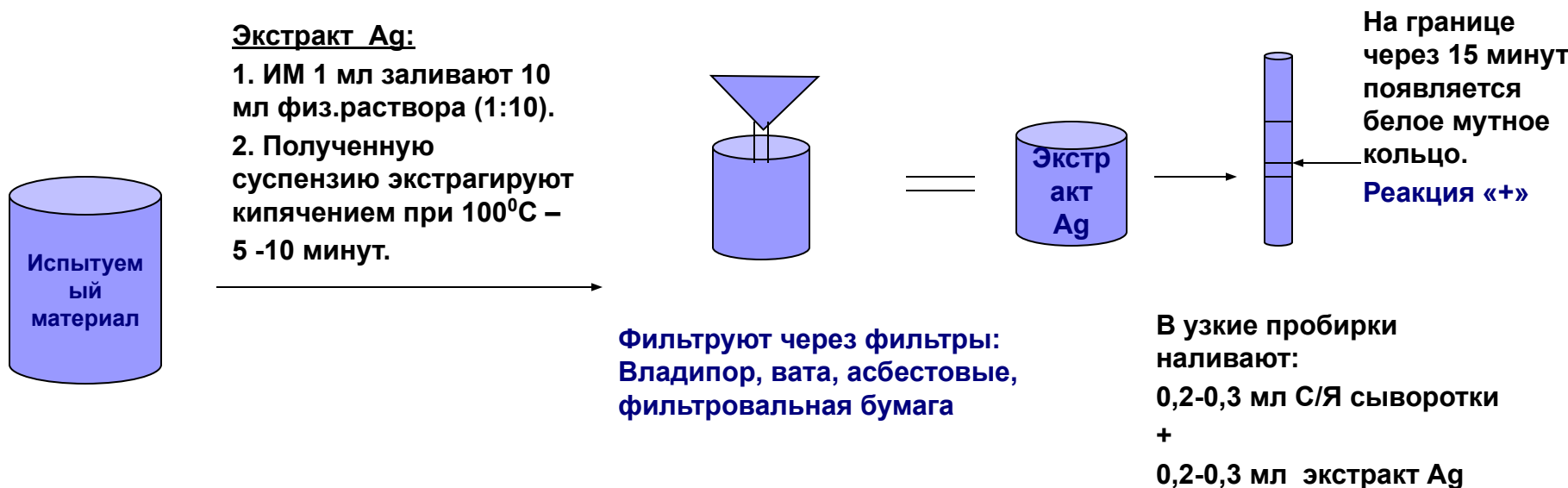
РИФ,
ПЦР,
ИФА,

РТП – Реакция термопреципитации по Асколи

- Реакция используется для обнаружения сибиреязвенного Ag.
- РТП используется при наличии струпов, несвежего материала, шкур, павших животных.
- Материалы для исследования:
 1. Преципитирующая сибиреязвенная сыворотка
 2. Ag из испытуемого материала
 3. Сибиреязвенный бактериальный Ag для контроля

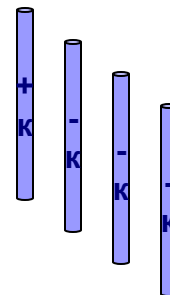
РТП – Реакция термореципитации по Асколи

■ Схема постановки.

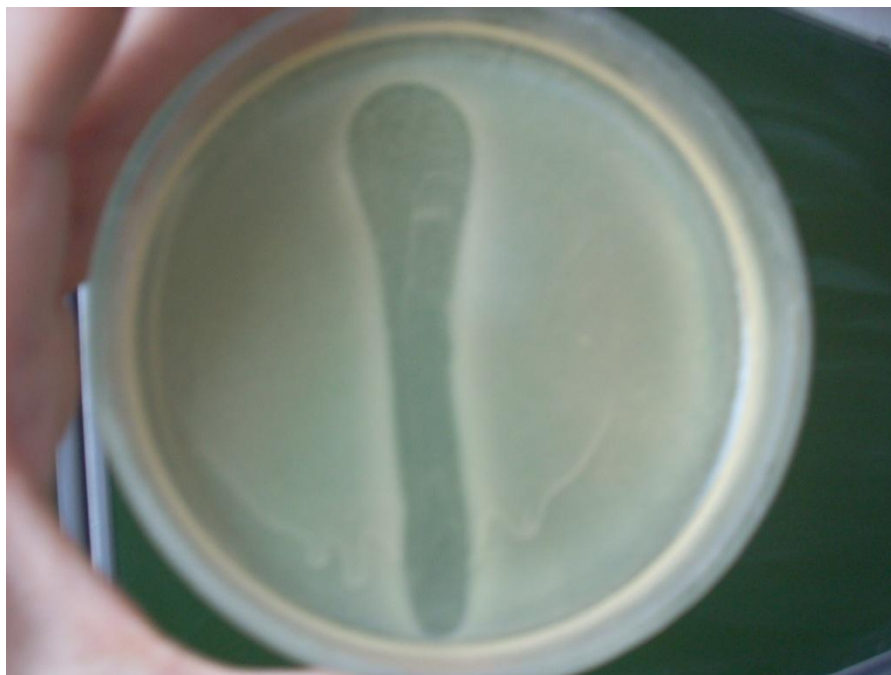


Параллельно ставятся контроли «+» и «-»:

1. Преципитирующая сыворотка + экстракт из материала больного животного – «+» К
2. Преципитирующая сыворотка + экстракт из материала здорового животного – «-» К
3. Преципитирующая сыворотка + физ.раствор – «-»
4. Нормальная сыворотка + исследуемый экстракт – «-»



Определение чувствительности к к сибиреязвенному бактериофагу



Определение чувствительности к антибиотикам диско-диффузным методом (ДДМ)

- Определяются размеры зон задержки в мм (или отсутствие) роста культуры;
- Определяется минимальная подавляющая концентрация препаратов (МПК).



На среде АГВ

- **Сибирская язва.**

Лечение.

- **Применяют противосибирезязвенный иммуноглобулин, антибиотики (пенициллины, тетрациклины и др.).**

Профилактика.

- **Применяют живую споровую безкапсульную вакцину СТИ, протективный антиген.**