Министерство науки и образования РФ

Московский государственный университет прикладной биотехнологии

Кафедра микробиологии и иммунологии

**Курсовая работа**

На тему:

**" Возбудитель сибирской язвы"**

Выполнил: студент вет.-сан. ф-та

II курса, 9 группы

Буданцев М.В.

Проверил:

Проф. Скородумов Д.И.

Москва 2005г.

Содержание:

Введение

1. Характеристика возбудителя

1.1 Морфологические свойства

1.2 Ферментативная активность

1.3 Антигенная структура

1.4 Устойчивость возбудителя

2. Эволюция

Заключение

Список используемой литературы

**Введение**

Возбудитель сибирской язвы - Bacillus anthracis - относится к отряду Eubacteriales, семейству Bacillacae, роду и подроду Bacillus. Бациллу впервые обнаружил под микроскопом Ф. Поллендер в Германии в 1849 г. В 1850 г.

К. Давэн и Ганс во Франции выявили нитевидные неподвижные тельца (цилиндрические палочки) в крови овец, погибших от сибирской язвы. В России Ф. Брауэль в 1857 г. нашел палочки (вибрионы) в крови человека, умершего от сибирской язвы, и экспериментально воспроизвел болезнь у животных, заразив их кровью, содержащей эти микробы. Но значение палочек оставалось невыясненным. Лишь и 1863 г. К. Давэп окончательно установил, что они являются возбудителем сибирской язвы. Этот год считают официальной датой открытия бациллы сибирской язвы.

Культуру возбудители болезни удалось получить лишь в 1876 г. Сначала Р. Коху, а затем Л. Пастору. Независимо друг от друга они заразили этой культурой животных, воспроизвели болезнь и открыли, что палочки сибирской язвы способны формировать споры. В 1888 г. Серафини у сибиреязвенных бацилл обнаружил капсулу. В России культуру сибиреязвенного микроба впервые получил В.К. Высокович (1882).

Род Bacillus объединяет 48 видов аэробных или факультативно-анаэробных бацилл, которые разделены на две группы: в первую включено 22 вида, во вторую — 20 видов. Лучше изучены, бациллы первой группы. Наиболее близки к бацилле сибирской язвы виды: Вас. cereus—восковидная бацилла Вас. cereus var.mycoides sive -корневидная бацилла; Вас. megaterium — капустная бацилла; Вас. subtilis sive — сенная бацилла; Вас. pumilus sive — картофельная бацилла. Все они сапрофиты, кроме Вас. sereus, которая синтезирует активный фермент патогенности лецитиназу и способна вызывать пищевые токсикозы.

**1. Характеристика возбудителя**

**1.1 Морфологические свойства**

Прочно заняв со временем новое экологическое место, бацилла стала самостоятельным паразитическим видом, сохранившим много сходных черт со своими предками сапрофитами (Колонин, 1970). Bac. anthracis — сравнительно крупная палочка (от 1 — 1,3 до 3—10 мкм), неподвижная, образует капсулы и споры, по Грамму красится положительно. Вегетативные клетки могут быть с капсулой и без нее. Споры заключены в хорошо выраженный экзоспориум.

В неокрашенных препаратах, приготовленных из крови и тканей животных, больных или погибших от сибирской язвы, бациллы имеют форму гомогенных прозрачных палочек со слегка закруглёнными концами. Они лежат поодиночно или соединены в короткие цепочки. Число клеток в цепочке у высоковирулентных штаммов, как правило, не превышает трех, а у низковирулентных их может быть больше.

Бациллы, выращенные на плотных или в жидких питательных средах, формируют цепочки разной длины. В мазках культур штаммов, дававших в жидких питательных средах типичный рост в виде хлопьевидного осадка, палочки чаще располагаются длинными цепочками, а в изготовленных из культур с атипичным диффузным ростом они образуют короткие цепочки. Клетки в цепочках неодинаковой величину и напоминают цилиндры. Поверхность клеток неровная.

В окрашенных цепочках концы палочек, обращенных друг к другу, прямые, как бы обрублены, свободные же концы слегка закруглены. Бациллы, синтезирующие капсулу при росте на средах, содержащих белки, и размножении в организме животных, формируют цепочки в виде бамбуковой трости, обрубленные концы клеток несколько вдавлены и в местах сочленения симметрично утолщены.

Бациллы имеют ядро. Ф.Я. Китаев (1922) установил, что оно принимает участие в делении вегетативных клеток и его часто обнаруживают у прорастающих спор. Позже наличие ядра у бациллы подтвердил Flewett (1948). В 1959 г. М.П. Мейсель и Л.В. Миролюбова определили, что ядро состоит из спиралевидных нитей, занимающих центральную часть клетки и располагающихся вдоль ее оси. Нуклеоид представлен в основном сетью фибрилл, лежащих беспорядочно, по равномерно по всей его площади. Chatterjee и Williams (1962) указывают, что у клетки из молодых культур хроматиновые тела имеют вид длинных непрерывных образований, располагающихся центрально. В зрелых клетках они бывают как непрерывными, так; и делящимися на половины. В клетках 24-часовых культур длинные хроматиновые тела расположены большими комплексами, состоящими из сферических образований. Авторы пришли к заключению, что сибиреязвенная бацилла имеет дифференцированный нуклеоид дискретного характера.

Дифференцированность нуклеоида была подтверждена Г. В. Дунаевым (1967, 1972) при исследовании им вегетативных клеток штаммов II вакцины Ценковского и СТИ-1, фиксированных и окрашенных методом Пекарского — Робиноу. Четко контурированный нуклеоид находили в бациллах на всех фазах их развития. Особенно хорошо выявляется структура ядра при комбинированном люминесцентном и фаловоконтрастном микроскопировании. В бациллах обнаружены ДНК и РНК, первая содержится в нуклеоиде, вторая — в цитоплазме.

Молекула ДНК-хромосомы двухцепочечная, замкнута в кольцо и своеобразно упакована в виде волокнистого тяжа, напоминающего перекрученный жгут соломы. Компактная форма ДНК поддерживается одноцепочечной рибонуклеиновой кислотой, в свою очередь связанной с РНК-полимеразой и катионными белками. Длина вытянутой молекулы ДНК-нуклеоида почти в 2 раза превышает длину самой бациллы.

Впервые о субмикроскопичсской структуре бацилл сибирской язвы сообщили Roth и Williams (1963, 1964); они обнаружили в вегетативных клетках микроба элементы дискретного нуклеоида. Затем ряд советских и зарубежных исследователей (Павлова и Кац, 1966; МоЬег1у, Shafa и Gerchardi, 1966; Белокозов, 1970; Тржецецкая и Куликовский, 1972, и др.) довольно подробно изучили строение вирулентных (№ 66 и 2222) и вакцинных (II вакцина Ценковского, СТИ-1, Стерна) штаммов бацилл.

Очевидно, у бациллы, способно к вегетации во внешней среде и в животном организме, очень развиты регуляторные механизмы, обеспечивающие обмен и жизнедеятельность при изменениях среды обитания. Совершенная система адаптации зависит от морфологической структуры клетки. Стенка бациллы состоит из трех слоев: из двух осмиофильных и одного осмиофобного. Но такое строение выявляют не всегда. Чаще стенка состоит из внутреннего осмиофильного, более плотного, и наружного, умеренно плотного, слоев. Наружный слой нередко переходит в фибриллярные структуры, расположенные по всей поверхности клетки. Полагают, что эти осмиофильные фибриллярные образования — остатки капсулы.

В клеточной стенке заметны канальцы, соединяющиеся с цитоплазматической мембраной и открывающиеся во внешнюю среду.

Цитоплазматическая мембрана гладкая или несколько извилистая. Лишь в некоторых участках клетки заметны ее три слоя, лучше они видны в лизированных бациллах. Чаще мембрана плотно примыкает к клеточной стенке, и выявляют ее в виде одного слоя. Мембрана имеет выпячивания в цитоплазму, различающиеся по форме, величине, строению и локализации; они описаны как внутрцитоплазматнчсские мембранные структуры. Выпячивания имеют форму завитков, овалов и неровных линий, у многих бацилл они проникают в зону нуклеоида.

В цитоплазме бацилл обнаруживают четко контурированные вакуоли. Обычно они крупные, ограничены мембраной, которая служит им каркасом. С наружной стороны ее лежат рибосомы. Расположены они цепочками, формируя полирибосомы. Последние лучше заметны в лизированных клетках. Нередко вакуоли сосредоточены вблизи нуклеоида. Gerhardi (1967) полагает, что вакуоли возникают в результате растворения в процессе фиксации и обезвоживания включений липидной природы и прежде всего гранул поли-ß-оксимасляной кислоты.

В бациллах находятся липопротеиновые гранулы, расположенные главным образом субтерминалыю н терминально. Выявлены также мезосомы (эквиваленты митохондрий). Они имеют форму четко контурированных, ярко светящихся желто-зеленым цветом гранул, контактирующих с цитоплазматической мембраной. Мезосомы полифункциональные. Мембранно-мезосомная система бацилл ответственна за окислительное фосфорилирование, перенос электронов, осуществление цикла ди- и трикарбоновых кислот, она вовлекается и в синтез белка (Бурд, 1967; 1968). В цитоплазме после окраски выдержанным раствором метиленового синего по Леффлеру в полярных участках бациллы, а иногда и в центральной части обнаруживают гранулы валютина, окрашивающиеся метахроматически.

При окраске суданом черным заметны липидные гранулы, которых особенно много в период спорообразования. Их находят у спорообразующих аэробных бацилл всех видов, в том числе и у сапрофитов. Цитохимической реакцией Хочкисса па полисахариды обнаруживают мелкие гранулы гликогена. Содержатся они как в обычных, так и в спорообразующих бациллах.

Размножаются бациллы способом деления. В клетке формируется поперечная перегородка, которая разделяет ее на две равно-половинные особи. Образование перегородки начинается с инвагинации цитоплазматической мембраны и вовлечения в этот процесс клеточной стенки. Постепенно клетка как бы перешнуровывается. Однако часто новое деление клеток начинается до завершения первого деления, что приводит к формированию стрептобацплл. Образующаяся цепочка состоит из клеток разной длины.

Бациллы выделяют экзотоксин, играющий ведущую патогенетическую роль в развитии болезни. В процессе биосинтеза и секреции экзотоксина при выращивании бацилл на специальных средах отмечают интенсивное развитие рибосомального и мембрано-мезосомалыюго аппаратов, между ними устанавливается тесная связь, н внутрицитоплазматические мембранные структуры проникают в зону нуклеоида. В экспоненциальной фазе роста культура состоит в основном из неделящихся клеток (Дунаев, 1972).

В зоне нуклеоида наблюдают большое скопление осмофильных масс. В некоторых участках клеток обнаруживают внутрицитоплазматические каналы, отличающиеся по морфологии от мембранных структур обычного типа у микробов этого вида. Они прямые, короткие. Каналы проходят через клеточную стенку и сообщаются с окружающей средой. Обнаруживают единичные клетки с лизированным протопластом, но хорошо сохранившимися мембранными структурами. У этих клеток часто находят участки разрушенной клеточной стенки.

В данной фазе бациллы секретируют токсин. Из бациллярной клетки он может транспортироваться тремя путями: токсин выходит через специальные каналы, через неразрушенную, но измененную клеточную стенку и через участки лизированной клеточной стенки. В плазме бацилл имеются включения компактных осмиофильных частичек. За пределами микроба они располагаются в менее оптически плотном веществе, тоже выделяемом бациллами. По мере удаления от бацилл частички становятся крупнее и между ними увеличивается расстояние. Описанное строение бацилл характерно для вакцинных и вирулентных штаммов сибирской: язвы.

**Образование капсул.** Бациллы в организме животного и при культивировании на питательных средах с большим содержанием нативного белка образуют капсулу. В присутствии кислорода воздуха она не формируется. Капсула — это наружный слизистый слой бациллы, ее рассматривают как слой эктоплазмы. На ультрасрезах она заметна в виде компактного толстого слоя, тесно примыкающего к стенке вегетативной клетки.

Капсула имеет несколько слоев. Внутренняя часть ее образована кислыми мукополисахаридами, средняя — белково-полисахаридным комплексами, наружная — мукопептидами и полипептидами. В наружных слоях капсулы и в оболочке клетки мукопептиды отличаются по своим свойствам. Капсула, состоящая из 98% воды, обладает защитным осмотическим действием против притока большого количества воды в бациллу и предохраняет ее от обезвоживания, а также от различных воздействий среды, в том числе и от иммунных механизмов организма. Капсула препятствует фагоцитозу

Вас. anthracis и способствует, по мнению Н.Н. Гинсбурга с сотр. (1960), фиксации их к клеткам макроорганизма. Полагают, что она определяет степень вирулентности бацилл. Бескапсульные сибиреязвенные бациллы лишены этих свойств. Капсула образуется как в жидких, так и на плотных сывороточных питательных средах. При росте на среде Гладстона и Филдса капсула начинает выявляться у некоторых бацилл через 3 ч инкубации (Машков и Бодиско, 1958), а к 14—10 ч она имеется почти у всех. Затем возникает диффузия капсульного вещества с поверхности клеток в окружающую среду. Хорошо образуются капсулы и при росте бацилл в сыворотке крови лошади по Шеферу, на сывороточном агаре, особенно при избытке С02, а также при выращивании в белковых средах, применяемых для получения протективного антигена. В данном случае образование капсулы начинается через 2'/2 ч роста и этот процесс бывает хорошо выражен у шестичасовой культуры; капсулы обнаруживают и у клеток через 24 ч роста. Элективным субстратом для биосинтеза капсул является белковая среда ГКИ. Капсулообразованию, кроме нативного белка, способствуют щелочная среда и наличие С02. Eastin, Thorne (1963) установили влияние С02 на активность некоторых митохондриальных энзимов бацилл. Вирулентные бациллы при образовании капсульного полипептида нуждаются в более высокой концентрации С02.

Для синтеза важнейшего фактора вирулентности — капсулы - необходимы аминокислоты лейцин, валин и метионин. Для оптимального размножения вирулентных штаммов бацилл требуются гипоксантин, метионин, аланнн и триптофан. Степень вирулентности во многом определяется условиями выращивания бацилл и составом среды.

В экспотенциалыюй фазе роста культуры вирулентных вакцинных штаммов наряду с капсульными выявляют и бескапсульные бациллы. Это свидетельствует о том, что в популяции штаммов появляются мутанты с иными генетическими свойствами, без капсульного полипептида глутамниовой кислоты.

В организме животного бациллы с капсулами обнаруживают через 2—3 ч после заражения, но в этот период их находят только в местах введения и регионарных лимфатических узлах. Они окружены тканевым детритом и расположены в зонах (светлых), обрадованных действием токсина микроба. При попадании бацилл в иммунный организм капсулы, по-видимому, образуются очень медленно и довольно редко. Морфологически капсулы бацилл, размножающихся в организме и выращенных па питательных средах, но имеют различия, только у последних капсула более массивная. Капсула более устойчива к процессам гниения, чем сама бацилла, поэтому в гниющем трупе животного, павшего от сибирской язвы, обнаруживают лишь «тени микробов», пустые капсулы.

**Образование спор.** Биологическая роль спор заключается в том, что они являются формой сохранения вида бацилл при неблагоприятных условиях существования. Споры могут длительное время находиться в природе, а следовательно, долго сохранять субстрат генетической информации исходных клеток (геном) и тем самым обеспечивать передачу основных свойств потомству последующих генераций.

Спорообразование происходит в средах с нейтральной пли слабощелочной реакцией при дефиците белковых веществ. Споры образуются в физиологическом растворе, дистиллированной воде, в нефиксированных мазках. Установлено, что этот процесс происходит быстрее в среде, содержащей чистый кислород, чем при аэрации культуры атмосферным воздухом. Образованно спор начинается с того момента, когда в среде соотношение форм белкового и минерального азота сдвигается в сторону преобладания последнего (Егоров и Сиицин, 1961). Добавление к среде нейтрального щавелевокислого натрия активизирует спорообразование, а 1%-лого раствора хлористого кальция — подавляет. Споры не образуются в средах, богатых белковыми веществами, например в крови и сыворотке крови, в живом организме и невскрытом трупе. При нарушении целостности трупа возможно спорообразование.

Вегетативные клетки, образующие споры (спорангии), содержат по одной споре, расположенной центрально или субтерминально. Диаметр споры не превышает ширину бациллы. Формирование споры начинается в момент перехода вегетативной клетки к стационарной фазе роста, при этом наблюдается ряд последовательных стадий:

1. В клетке формируется два нуклеоида, которые вскоре объединяются в палочковидное образование.

2. В одном участке клетки появляются выпячивания клеточной мембраны с мезосомой. Они формируют поперечную перегородку, которая отделяет свободную от липопротеиновых зерен часть цитоплазмы и ДНК от остального содержимого клетки. В результате этого изолируется участок будущей споры, окруженный мембраной.

3. Изолированный участок окружается мембраной клетки; образуется проспора с двойной мембраной.

4. Пространство между споровой и клеточной (второй) мембранами расширяется, содержимое его становится гомогенным, возникает так называемый кортекс, благодаря которому спора более заметна при микроскопическом исследовании.

5. Вокруг наружной мембраны, покрывающей кортекс, формируется оболочка. Из всех структур споры она отличается наибольшей способностью рассеивать электроны. Затем споровая оболочка покрывается более рыхлым и тонким слоем — экзоспориумом. Сформированная спора выходит из бациллы через разрыв участка клеточной стенки. Внутри бациллы споры не прорастают.

Таким образом, сформировавшаяся спора состоит из следующих основных слоев:

- спороплазмы (центральная ее часть). Состоит она из гомогенного материала с мелкозернистыми осмиофильными гранулами; нуклеоид обнаруживают в виде нечетко контурированной зоны осмиофобного материала;

- цитоплазматической внутренней мембраны, окружающей саркоплазму;

- кортекса, расположенного на поверхности цитоплазматической мембраны. Представлен он массивным светлым оптическим слоем, состоит из пептидогликана. Из внутреннего его слоя формируется оболочка при проростании споры:

- внешней двухслойной мембраны споры толщиной и покрывающей кортекс;

- слоя цитоплазмы между внешней мембраной и оболочной

споры;

- оболочки споры, по данным И.И. Белоконова (1970), Т.А. Тржецецкой, Л.В. Куликовского (1972), она имеет до 6 слоев; внутренней стороной оболочка прилегает к внешней мембране споры, с внешней — имеет множественные выпячивания;

- экзоспориума.

Споры — овальные, иногда округлые образования, сильно преломляющие свет. Длина прелых спор 1,2—1,5 мкм, ширина 0,8— 1 мкм, незрелых (проспоры) — несколько меньше. Зрелые споры, оттененные хромом или контрастированные фосфорно-вольфрамовой кислотой, выявляются в электронном микроскопе в виде оптически непроницаемых образований с неровными контурами; более молодые споры и проспоры однородны, темные. Метод углеродных реплик по Bredli и Williams (1957) позволяет обнаружить на поверхности спор ребра. Они располагаются продольно или в виде ячеек и четче выражены у спор из старых культур (15 сут.) (Белоконов, 1970). Shafa и Sato (1966), исследовавшие штамм Стерна, выявили на поверхности экзоспориума ворсинки. Наличие их подтвердил

И.И. Белоконов (1970), научавший вакцинные штаммы СТИ-1 и II вакцины Ценковского.

У спор вакцинного штамма СТИ-1 обнаружены паро-споровые тельца, подобные тем, которые ранее были описаны у некоторых сапрофитных спорообразующих микробов. Они имеют правильную сферическую форму, расположены на поверхности спор пли лежат раздельно. Диаметр их разный: мелких 1200. А, средних 1564 А и крупных 2000 А. Значение этих телец не выяснено (Дунаев и Белоконов, 1968).

Начало образования спор зависит от особенностей штамма и температуры среды. При 30— 37 °С оно обычно заканчивается через 1 — 2 ч, при 24°С — через 16 ч, при 18°С затягивается до 70 ч. Ниже 15°С и выше 42С спорообразование не происходит. У некоторых штаммов интенсивно этот процесс начинается через 18—20 ч с момента засева среды и культивирования при 37 °С (Белоконов, 1970; Авакян, Кац, Павлова, 1972). На плотных средах споры образуются быстрее, чем в жидких. Процесс их формирования у хорошо спорулирующих штаммов обычно завершается на МПА через 48—72 ч.

Для прорастания спор необходимы аминокислоты (источник азота), углеводы (особенно глюкоза) и предшественники нуклеиновых кислот, 1-аланин н 1-тирозин (Земсков н соавт., .1972).

Морфологические изменения, свидетельствующие о начале прорастания спор, выявляются через 5—10 мин после засева их на питательную среду (температура 37°С). Они характеризуются набуханием спор и появлением по их периферии небольших светлых участков. Прорастающая спора теряет блеск, принимает шаровидную форму, затем вновь вытягивается и из одного конца ее выходит бацилла в направлении продольной оси, сбрасывая споровую оболочку; вышедшая бацилла похожа на материнскую сибиреязвенную бациллу, только у нее более закруглены концы.

**Химический состав.** В сухом остатке вегетативных клеток содержится 6,8% азота и 12—13,5% минеральной золы, в сухом остатке спор — соответственно 12,14 и 41,15%. Количество ДНК варьирует в зависимости от штамма. Наиболее высокий уровень РНК наблюдается у бактерии, находящихся в экспотенцеальной фазе роста. Бациллы сибирской язвы имеют ферменты: липазу, диастазу, протеазу, желатиназу. дегидразу, ци-тохромоксидазу, пероксидазу, каталазу, аргиназу и др.

Из тела микроба выделен соматический антиген, в состав которого входит полисахарид, содержащий в эквимолекулярных пропорциях N-ацетилглюкозамин и галактозу, а также незначительное количество 0-ацетила и остатки аминокислот.

В составе оболочки и капсулы сибиреязвенного микроба обнаружены 3 антигенных комплекса:

поверхностные антигены капсулы, являющиеся, по-видимому, пептидами, чувствительные к действию пепсина и частично трипсина;

собственно капсульные антигены, расположенные в основном слое капсулы, содержат вещества белково-полисахаридной природы, чувствительные к действию трипсина, хемотрипсина, гиалуронндазы и лизоцима;

антигены оболочки клетки, содержащие вещества как полисахаридной, так и белковой природы, чувствительные к действию лизоцима и трипсина (Левина и Кац, 1964; Лвакян н соавт., 1907).

По данным Е.П. Левиной и Л.П. Кац, антигены, обнаруживаемые с помощью флуоресцирующей сибиреязвенной сыворотки, локализованы в оболочке. Споры содержат аланинрацелеазу, нуклеозидрибозидазу, аденозиндезамнназу. У покоящихся спор эти ферменты обеспечивают слабый уровень энергетического обмена (дыхания).

**1.2 Ферментативная активность**

Из многочисленной группы аэробных бацилл, обитающих в почве, только Bacillus anthracis приобрела наиболее выраженные вирулентные свойства и способность вызывать у животных и человека болезнь со смертельным исходом. Она имеет ряд сходных морфологических и культуральных свойств с указанными непатогенными спорообразующими микробами. Особенно много идентичных признаков отмочено у Bacillus anthracis и Вас. сегeus. Имеется большой фактический материал относительно токсикогенности Вас. сегeus и её биохимической активности.

При электронно-микроскопическом исследовании у обеих бацилл (Шахбанов, 1975) выявлены как общие характерные, так и нетипичные признаки. Так, клеточная стенка у Bac. anthracis более толстая и внутри имеется фибриллярный материал, а у Вас. cereus на стенке расположены грибовидные выросты. И.Б. Павлова и Л.П. Кац (1966) выявили у Bac. anthracis более развитые мембранные структуры, что, по их мнению, вызвано большей активностью окислительно-восстановительных ферментов. Вас. cereus в отличие от Bac. anthracis быстро свертывает растворы желтка куриного яйца; имеет чрезвычайно активную лецитиназу. Она медленно редуцирует метиленовый синий, слабо восстанавливает нитраты и нитриты, вырабатывает желатиназу, а также протеазу и достаточно быстро гидролизует желатину и свернутую сыворотку.

**1.3 Антигенная структура**

Вас. anthracis изучена еще недостаточно.

Н.Ф. Гамалея (1928) установил, что в подкожном отеке, образующемся на месте введения возбудителя, содержатся ядовитые вещества, вызывающие при введении в кровь быструю гибель кролика. Watson, Bloom (1947) получили экстракты из отёков больных сибирской язвой кроликов. После внутрикожного введения животным экстрактов регистрировали такие же гистологические изменения, как и при заражении литыми бациллами. У кроликов эти экстракты вызывали образование иммунитета, в слабой степени он проявлялся у морских свинок и белых мышей.

Watson и Со11 (1947) выделили у бациллы две субстанции, они различались физическими, химическими и биологическими свойствами. Первая из них вызывала воспаление тканей, стремилась к аноду, вступала в реакцию с фосфатом Са, вторая имела протеиновую природу, была не токсична, обладала иммунизирующими свойствами.

В 1953 г. Smith и Со11 выделили сибиреязвенный экзотоксин из плазмы крови морских свинок, погибших от этой болезни, а затем и из культуральной жидкости при выращивании Вас. anthracis на жидкой питательной среде. Установлено, что токсин не имеет отношения, как полагали раньше, к капсульному веществу, состоящему из полиглютаминовой кислоты, но он обладает близким родством с протективным антигеном.

Smith (1958) выяснил, что токсин содержится не только в отечной жидкости, но и в достаточно высокой концентрации в плазме крови и в меньшем количестве в плевральном и перитонеальном экссудатах. Токсин вызывал не только местную воспалительную реакцию (отек) с явлениями разрушения тканей, но и гибель морских свинок и белых мышей от вторичного шока. Эта токсическая субстанция была обозначена как летальный фактор, а в 1955 г. названа сибиреязвенным токсином.

Сибиреязвенные антисыворотки, полученные от лошадей, ги-периммунизированных как капсульными, так и бескапсульными штаммами бацилл, подавляли действие токсина. Это указывало на то, что происхождение токсина не связало капсулой. Токсин также нейтрализовался сывороткой кроликов, иммунизированных проективным антигеном.

Evans (1954) выделил сибиреязвенный экзотоксин in vitro. Smith (1958) установил, что вирулентные и бескапсульпые вакцинные штаммы синтезируют одинаковые по силе токсины. Максимальной силой токсин обладал к I'/2 ч от начала инкубации. Количество его находилось в прямой зависимости от числа бактерии в культуре. По своим свойствам токсин, полученный в культуре, не отличался от такового, синтезируемого бациллами in vitro; он вызывал образованно антител у животных и нейтрализовался лошадиной противосибиреязвенной сывороткой.

В 1958 г. Smith определил, что у нативного сибиреязвенного токсина четко различаются отечный и летальный факторы. Molner и Strange (1960) разделили токсин на два фактора. Один из них проходил через стеклянный фильтр и обладал свойствами протективного антигена, второй задерживался на фильтре, но легко элюнировался путем обработки 0,1 М карбонатным буфером при рН 9,7. Оба фактора сами по себе не были токсичными, но их смесь проявляла выраженное токсическое действие — вызывала воспалительные реакции в коже морских свинок и гибель мышей. Установлено, что второй фактор состоит из двух антигенов.

Stanley и Smith (1961) показали, что, кроме указанных двух факторов (компонентов), имеется еще одни, серологически отличающийся от них; он присутствовал в токсине, образующемся как в организме, так и в культуре. Эти факторы были обозначены цифрами I, II и III. Веа11, Тау1ог, (1962) предложили другие обозначения: EF (эдематогенный, или воспалительный, фактор); РА (иммуногенный—протективный антиген) и LF (летальный фактор), которые соответствовали I, П и III факторам.

Следовательно, токсическими свойствами обладает смесь из I и II компонентов (увеличивается проницаемость капилляров, что обусловливает отек). Но компонент II имеет проективные свойства, вызывая нммуногенные процессы в организме. Добавление к нему компонента I значительно увеличивает его иммуногенность, но в смеси с компонентом III протективные свойства снижаются. Компонент III не обладает токсичностью, но при добавлении его компоненту II придает смеси летальные свойства. Все три компонента токсина составляют синергическую смесь, обладающую одновременно эдематогенным и летальным действием. Это показывает, что токсин сибиреязвенных бацилл — трехкомпонентная система. Полный комплекс сибиреязвенного токсина, синтезируемого in vitro, нейтрализуется лечебным противосибиреязвенным глобулином (Федотова, Уланова, 1970).

Все три компонента сибиреязвенного экстрацеллюлярного токсина обладают антигенными свойствами и серологически активны. Токсин, синтезируемый in vivo, отличается от токсина, получаемого in vitro, более быстрым летальным действием и трудностью обнаружении.

Выяснено, что у возбудителя сибирской язвы имеется ряд антигенов: полисахаридный комплекс; капсульный полипептид; экзотоксин, в состав которого входит три компонента — воспалительный, иммуногенный (протектнвный антиген) и летальный. Каждый из микробных агентов (токсины, поверхностно-активные •вещества, нуклеиновые кислоты н пр.) взаимодействует лишь со строго определенными молекулярными мишенями в атакуемых клетках. Они воздействуют лишь на те молекулы, с которыми у них имеется химическое родство, дополненное соответствием структур и функции, т. е. химической комплементарностыо. Если подходящих мишеней нет, то микробная атака неэффективна. В этом и заключена тайна наследственного иммунитета. Изменение варианта расположении комплиментарных аминокислот (единичных из множества) создает невосприимчивость (Румянцев, 1984).

Вирулентность сибиреязвенных бацилл определяется двумя факторами агрессии: капсулой, представляющей полипептид d-глутаминовой кислоты; экзотоксином, состоящим из трех в отдельности нетоксичных белковых компонентов; смесь их, как указано выше, вызывает отечность и летальность.

Первым антигеном, выделенным из Вас.anthracis, был полисахаридный (соматический) комплекс. Он имеет серологическое и химическое родство с полисахаридами Вас. cereus и пневмококками IV типа. По мнению

Ю.В. Езепчука (1968), отсутствие видимой специфичности у полисахаридов дает основание полагать, что они выполняют у Вас. anthracis лишь структурную функцию и не (имеют отношение к факторам патогенности.

Другой антиген — капсульный полипептид, серологически трунновой; его обнаруживают и у сапрофитных спорообразующихся бацилл.

Капсульный полипептид рассматривают как один из важных факторов агрессии сибиреязвенной бациллы, так как он подавляет защитную фагоцитарную реакцию организма, повышает активность летального фактора экстрацеллюлярного сибиреязвенного токсина и одновременно подавляет опсонизацию. Однако соматический полисахарид и капсульный полипеитид глутаминовой кислоты бацилл не способны обусловливать синтез антител, определяющих фон специфической гуморальной защиты организма животного против возбудителя сибирской язвы. Эту роль у бацилл выполняет протективный антиген (компонент II) —внеклеточная субстанция протеиновой природы, синтезируемая в процессе метаболической активности микроба в организме животного или на специальных питательных средах и выделяемая бактериальной клеткой в окружающую среду.

Будучи одним из факторов патогенности, иммуногенный компонент сибиреязвенного микроба обусловливает формирование иммунитета к этой инфекции по типу антитоксического (Stanley и Smith, 1963). Он служит носителем специфических защитных свойств.

Имеющиеся данные свидетельствуют о значительной роли экзотоксина бациллы в проявлении многих типичных черт инфекционного процесса и формировании специфической защиты организма. Это дает основание рассматривать его как фактор, определяющий патогенез и иммунитет при сибирской язве.

**1.4 Устойчивость**

Устойчивость и длительность выживания бацилл и их спор различны. Первые относительно лабильны, вторые довольно резистентны. Бациллы в мягких тканях невскрытого трупа могут сохраняться 2—4 сут. (Ипатенко, 1982), так как разрушаются под воздействием протеолитических ферментов. В костном мозге неповрежденных костей этот процесс происходит несколько позже — бациллы остаются жизнеспособными здесь до 7 сут (Франке, 1964; Ипатенко, 1964- 1982).

Плюсовые температуры бациллы выдерживают недолго. Прямой солнечный свет убивает их за несколько часов. При нагревании до 50—55 °С они гибнут в течение часа, при 60 °С— через 15 мин, при 75 °С— через минуту, при кипячении — моментально. Быстрое высушивание убивает бациллу, а медленное приводит к образованию спор. Бациллы могут погибнуть через 2 недели при температуре 2—4°С. В желудочном соке животных бациллы погибают за 30 мин, в засоленном мясе сохраняются до 15 дн.

Минусовые температуры консервируют бациллы. Так, при —10 СС они выживают 24 дн., при —24 °С — 12 дп., в замороженном мясе при —15 °С — до 15 дп. Они могут сохраняться даже при температуре жидкого азота (—196°С).

Бациллы малоустойчивы к различным химическим веществам. Спирт, эфир, 2%-ный раствор формалина, 5%-пый раствор фенола, раствор сулемы 1: 1000,5—10%-ые растворы хлорамина, свежий 5%-ый раствор хлорной извести, перекись водорода разрушают их за 4—5 мин. Надежно убивают бацилл бромистый метил. ОКЭБМ (взвесь одной весовой части окиси этилена и 2,5 бромистого метила).

Свежее молоко тоже обладает бактериостатическими свойствами (оно задерживает развитие бацилл), но действие это сохраняется лишь 24 ч, позднее бациллы начинают размножаться, образуют споры, сохраняя присущую им патогенность. Антимикробные свойства молока обусловлены лизоцимом и лактинами — продуктами ферментативного окисления (Абдуллин и Капарович, 1971; Ипатенко, 1982). Рост бацилл может задерживать свежая кровь животных (Ипатенко, 1964—1982).

Бациллы чувствительны к действию некоторых антибиотиков — пенициллина стрептомицина, окситетрациклина, тетрациклина н биомицина. Бактериостатические свойства проявляются как in vitro, так и in vivo. Минимальные концентрации стрептомицина, задерживающие рост бацилл, колеблются о пределах 1,15— 2,34 мкг/мл; окситетрациклина — 0,22— 1,87 мкг/мл (Ипатенко, 1983).

При росте на МПА бациллы под влиянием низких доз пенициллина принимают форму шаров. Цепочки их приобретают вид «жемчужного ожерелья». Реакция эта специфична и может быть использована для ускоренной дифференциальной диагностики.

Антимикробное действие стрептомицина и окситетрациклина на вирулентные и вакцинные штаммы, взятые отдельно и в сочетании, не одинаково. Смесь стрептомицина с окситетрациклином обладает более выраженным действием, чем каждый из них отдельно. Одинаковые суммарные концентрации их в микрограммах на 1 мл среды превосходит в 2 раза действие окситетрациклина и в 4 раза — стрептомицина (Новиков, 1960). Следует учитывать, что в природе существуют особи бацилл, резистентные к антибиотикам.

Устойчивость спор. Споры гораздо устойчивее, чем вегетативные формы бацилл, и во внешней среде сохраняются дольше. Высокая устойчивость спор к различным воздействиям связана с наличием плотной многослойной оболочки, низким содержанием воды в ней и отсутствием ферментативной активности. Одним из важнейших факторов, обусловливающих высокую устойчивость спор, является присутствие кальциевой соли дипиколиновой кислоты; содержание кальция в спорах значительно выше, чем в вегетативных телах.

Резистентность спор во многом зависит от того, насколько быстро они сформировались. Споры, образовавшиеся при 18— 20°С, более резистентны, чем споры, сформировавшиеся при температурах 35— 38 СС (Рево, 1931). Споры могут при определенных условиях сохраняться десятилетиями во внешней среде ( почве) жизнеспособными и вирулентными (Ипатенко, 1982).

Высушивание не оказывает воздействия на споры. В высушенных агаровых и желатиновых культурах споры остаются жизнеспособными и вирулентными до 55 лет. Прямой солнечный свет разрушает споры лишь через 4 дня (Франке, 1964; Ипатенко. 1982), но губительно на них действуют ультрафиолетовые лучи и Х-лучи — споры гибнут через - 20 ч. Сухой жар (120— 140°С) убивает споры только через 2—3 ч, при 150°С они гибнут через 1 ч, текучий пар при 100°С разрушает их через 12—15 мин, автоклавированно при 110°С — через 5 — 10 мин, кипячение — в течение часа. При 400 С споры гибнут через 20—30 с.

Споры устойчивы и к химическим веществам. Этиловый спирт в концентрациях 25% и выше убивают споры лишь через 50 дн., сулема в разведении 1000,5%-ный раствор фенола, 5— 10%-ые растворы хлорамина разрушают их через несколько суток (возможно и часов), 1%-ный раствор формалина — через 2 ч, 2%-ый раствор формалина — через 10 — 15 мин, 4%-ый раствор перманганата калия — через 15 мин, 3%-ный раствор перекиси водорода — через 1 ч, 10%-иыя раствор едкого натра — через 2 ч. По данным М.А. Сефершаева (1964), споры устойчивы к смоляным фенолам, являющимся отходами сланцевой промышленности.

Активными дезинфектантами, обладающими бактерицидным спороцидным н фунгицидным действием, оказались три препарата из группы межгалоидных соединений — солянокислый раствор однохлористого йода (препараты № 74 и 74-Б), пирам и ниран и один препарат из группы хлорактивных соединений — гипохлор (Бошьян, Дмитриева, 1968).

Внесение в почву химических веществ заметно не скалывается количество микроорганизмов, но неизбежно меняет их видовой состав, при этом нарушает нормальное течение микробиологических процессов в почве (Конобеева, 1964). Однако химические препараты, подвергаясь действию микробов почвы, могут сами превращаться в другие соединения, даже более ядовитые, чем исходные. В связи с этим нужно особенно осторожно выбирай, средства и методы обеззараживания почвы (Красильников, 1965).

**2. Эволюция**

Вопрос о происхождении и эволюционных связях Bac. anthracis с другими почвенными спорообразующими бациллами, в том число и с Вас. cereus, остается дискуссионным. Попытки в экспериментальных условиях превратить один вид микробов в другой заканчивались неудачей. Никаких разновидностей Bac. anthracis в природе не найдено (Гинсбург, 1960),

В.Л. Краминский, И. Соркин (1970) полагают, что вначале возбудитель сибирской язвы обитал в природе как сапрофит, затем постепенно приспособился к паразитированию в организме животных.

Большинство исследователей (Колонии и др., 1970) возникновение сибирской язвы как болезни относят к четвертичному периоду, т. е. ко времени широкого расселения на Земле парнокопытных. Вирулентные свойства возбудителя в то время формировались в условиях всеобщей восприимчивости животных, отсутствия среди них иммунного поголовья.

Травоядные животные (особенно жвачные), поедая растения, могли повреждать слизистую оболочку пищеварительного канала. В этих местах почвенные микробы имели возможность проникнуть в организм хозяина (Абдуллин, 1976). В результате многих таких контактов у микроба мог возникнуть мутант, способный к капсулообразованию в организме. Далее селекция по приобретению патогенности пребывающим в организме капсульным микробом, видимо, шла в сторону выделения токсических метаболитов.

В ходе эволюции жизнеспособное потомство микробов давало мутанты, которые обладали главным свойством вида — вызывать заболевание и гибель восприимчивых животных. При последующих заражениях и смене хозяев происходило закрепление в генотипе новых свойств (и прежде всего вирулентности), необходимых для дальнейшего воспроизведения и сохранения микроба.

**Заключение**

Решение проблемы ликвидации сибирской язвы во многом зависит от знания экологии возбудителя с учетом влияния на него различных факторов внешней среды, закономерностей распространения болезни, особенностей эпизоотического ее проявления. Следует учитывать, что область распространения сибирской язвы связана с почвенно-географическими зонами. Поэтому большую роль играют эффективные методы выявления и санации почвенных очагов возбудителя.

Борьба с сибирской язвой должна основываться на хорошо продуманном плане, предусматривающем выяснение и ликвидацию каждого стационарно неблагополучного пункта. Ежегодно появляются новые данные об эпизоотологии болезни, жизнедеятельности возбудителя в организме и во внешней среде. Накапливаются данные о его изменчивости. Совершенствуются методы диагностики, профилактики болезни и лечения животных, разрабатываются новые методы дезинфекции почвы.

**Список используемой литературы**

1. Ипатенко Н.Г. Изучение культурально-морфологических особенностей и вирулентных свойств Вас. аnthracis, выделенных из почвы, от больных и павших животных. - М., 1979.
2. Ипатенко Н.Г. Лабораторные методы исследования при сибирской язве // Ветеринария, 1983, № 7.
3. Кац Л.Н. Цитологическое и цитохимическое исследование капсулы и оболочки Вас. аnthracis // Микробиология. — Т. 33, вып. 5, 1964.
4. Коган И.Я. К вопросу эпизоотология сибирской язвы в Западной Сибири и меры профилактики//Тр. Новосибирского СХИ. — Т. 45, 1971.
5. Коляков Я.Е., Мелихов А.Д. Экспресс-диагностика сибиреязвенного микроба в воде // Ветеринария, 1960. № 3.
6. Коротич Л.С. Погребняк Л.И. Сибирская язва. — Киев: Урожай, 1976.
7. Кузьмин Н.А. К вопросу об антигенах оболочки Вас. аnthracis // Труды
8. МВА. - Т. 61, 1972.
9. Левина Е.Н., Архипова В.Р, Изучение сибиреязвенных бактериофагов // ЖМЭИ, 1967, № 7.
10. Преснов И.Н. Изменчивость Вас. аnthracis в природных условиях // Ветеринария, 1966, № 7.
11. Румянцев С. Микробы, эволюция, иммунитет // Наука и жизнь. - 1984, № 8,
12. Сибирская язва. - М.: Колос, 1976.
13. Тржецецкая Т.А., Куликовский А.В. Структурные изменения спор вирулентного штамма Вас. аnthracis после воздействия дезинфицирующими средствами // ЖМЭИ, 1971, № 8.