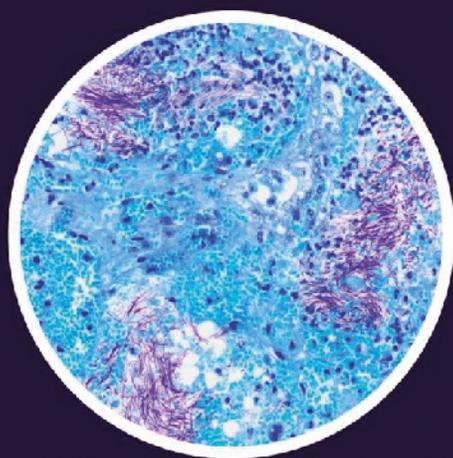


В. А. Горшков - Кантакузен

Мистерии сибирской язвы



Издательство Московского университета

В. А. Горшков-Кантакузен

Мистерии сибирской язвы

Учебник

*Рекомендовано Ассоциацией медицинских микробиологов
в качестве учебника для углубленного изучения студентами
медицинских, биологических и ветеринарных высших учебных
заведений, в качестве учебного пособия для слушателей курсов
профессиональной подготовки по работе с возбудителями
особо опасных инфекций*



Издательство Московского университета

2026

УДК 616.9+579.6(075.8)
ББК 55.146.26+28.487я73
Г70

РЕЦЕНЗЕНТЫ

Анатолий Алексеевич Гусев — доктор ветеринарных наук, профессор, член-корреспондент Российской академии наук

Сапарбай Тезекбаевич Жолдошев — доктор медицинских наук, профессор кафедры эпидемиологии, микробиологии с курсом инфекционных болезней Ошского государственного университета (Кыргызская Республика)

Татьяна Валерьевна Припутневич — доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент Российской академии наук, главный внештатный специалист по медицинской микробиологии Минздрава России, директор Института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии, НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова Минздрава России, зав. кафедрой медицинской микробиологии им. акад. З. В. Ермольевой Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования Минздрава России

Александр Михайлович Семёнов — доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник кафедры микробиологии биологического факультета Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова

Виталий Сергеевич Тимофеев — кандидат биологических наук, заместитель директора по аналитической работе, ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии (Оболенск)

Оглавление

К читателю	7
------------------	---

Раздел I

1. Три вехи истории	13
2. Мир глазами Коха	23
3. Внутренний мир и эволюция	46
4. Штаммы из Кот-д'Ивуара и Камеруна	58

Раздел II

Bacillus anthracis

5. Экология	85
6. Ямальская вспышка	95
7. Патогенез	102
8. Клиника сибирской язвы у животных	125
9. «Сибирская язва» черепаха	132
10. Клиника кожной формы сибирской язвы у человека	137
11. Клиника желудочно-кишечной формы сибирской язвы у человека	147
12. «Переходная форма» или случай в Оше	161
13. Клиника лёгочной (ингаляционной) формы сибирской язвы у человека	165
14. Инъекционная форма сибирской язвы	174
15. Атипичные симптомы и «искусственная» эпидемиология	181
16. Дифференциальная диагностика	201
17. Классификация	224
18. Лечение	226
19. Профилактика	262
20. Материал	285
21. Культура и её свойства	291
22. Животные	315
23. Реакция «антиген – антитело»	330
24. Антибиотикочувствительность	339
25. Молекулярно-генетические методы	348

Раздел III

Bacillus cereus sensu stricto

26. Экология <i>B. cereus sensu stricto</i>	355
27. Не всё так просто	359
28. Клиника <i>B. cereus ss</i>	366
29. Лабораторная диагностика <i>B. cereus ss</i>	382

Раздел IV

Bacillus thuringiensis

30. Экология <i>B. thuringiensis</i>	397
31. Скрытая угроза.....	405

Раздел V

Иные представители *Bacillus cereus complex*

32. В мире <i>B. cereus complex</i>	415
Прописи (рецептуры) некоторых питательных сред, применяемых для работы с возбудителем чумы	429
Список литературы	432

*Посвящается моей крестнице
Василисе Жупериной
и её родителям*

*Автор выражает бесконечную благодарность всем, кто несмотря на сложности и колоссальную занятость, оказал помощь в создании этой книги своими ценными советами, замечаниями и предложениями, позволившими значительно улучшить первоначальный текст. В первую очередь рецензентам, а также врачу **Ксении Валерьевне Хлоповой**, профессору **Евгению Ивановичу Еременко**, врачу **Ивану Олеговичу Мордвинову**, профессору **Льву Григорьевичу Бруку**, профессору **Александру Степановичу Балезину**, профессору **Ольге Викторовне Нечаевой**, моей семье, друзьям и коллегам*



Автор также выражает бесконечную признательность тем организациям, что на безвозмездной основе предоставили иллюстративный материал для этой книги, особенно,

Институту Роберта Коха



В случае возникновения вопросов и пожеланий, пожалуйста, направляйте их на santacuzenesopera@gmail.com

К читателю

«Мистерии сибирской язвы» – это вторая книга серии про возбудителей особо опасных бактериальных инфекций, посвящённая сибиреязвенному микробу и его ближайшим родственникам. Это удивительная история (др.-греч. μυστήριον), наполненная тайнами и загадками. Это медицинский детектив (англ. mystery), в котором ответы на вопросы порой меняют представление о, казалось бы, очевидных вещах.

Как и прежде, повествование пойдёт под непривычным углом мира бактерий, в связи с чем автор покорно просит, во-первых, читать книгу (а не учить или конспектировать), а во-вторых, – и это важно! – приложить максимум усилий, чтобы представлять то, о чём пойдёт речь. Неважно, какой уровень подготовки у Вас имеется. Неважно, с какой скоростью Вы соединяете сложный пазл информации. Важно, чтобы Вы пропустили написанное через себя и прожили страницы этой книги вместе с её главными героями.

Возможно, какие-то места окажутся сложными для понимания. Не стесняйтесь, прочтите их ещё раз. Возможно, по мере прочтения Вы что-то забудете, и это не страшно, ведь всегда можно вернуться назад. Главное, идите вперёд, ведь, как сказал Ханс Цинссер, *инфекционные болезни – одно из немногих настоящих приключений, оставшихся в мире*¹. И автор надеется, что это путешествие оставит неизгладимое впечатление на всю профессиональную жизнь.

Для удобства восприятия текста в настоящем издании разработана система сносок. Сноска, заключённая в круглые скобки (), относится к дополнительному материалу, призванному расширить понимание основного текста. Чаще всего такая сноска содержит ссылку на источник литературы, с которым при желании можно ознакомиться. Сноска, заключённая в угловые скобки < >, относится к источнику литературы, в котором описано важное открытие или опыт, о которых речь идёт в тексте. При желании Вы можете ознакомиться и с ними. Ведь это так приятно – читать первоисточник!

¹ Ориг. англ.: *Infectious Disease is one of the few genuine adventures left in the world.*

Зима. Темнеет. Холодный ветер пробирает до дрожи. Ноги утопают в снегу. И голые искорёженные деревья, словно мысли, цепляясь острыми ветками, мешают идти. Но вот виднеется огонёк. Туда, на опушку, бредёт еле живой юноша, желая согреться и найти ответы на свои вопросы. Сидящий возле костра старец вещает: «Взгляните на небо, на россыпь звёзд, и найдите в нём Лося. Это Лось небесный. Он обитает на самой вершине верхнего мира, там, куда долетают лишь редкие птицы, в самой кроне мирового дерева. В его рогах днём сияет солнце, а ночью светит луна. В нашем, среднем, мире тоже есть лоси. Это лоси земные. И поскольку все они потомки Лося небесного, мы почитаем их. Когда же наступает его время, лось перерождается в мамонта: рога его вытягиваются в бивни, и он уходит в нижний мир, кишачий страшными существами, чтобы там защищать от них вход в наш мир. И ежели кто-то навредит лосю земному, то он озлобится. Семена злобы прорастут в нём, и, когда придёт его время в нижнем мире, они просочатся в землю нашего мира, неся горе и смерть»¹...

¹ Считается, что именно так представляли себе жизнь народы древней Сибири и, в частности, представители так называемой кулайской культуры, от которой до нас дошли бронзовые литые фигурки (найлены в 1920 г. на горе Кулайке, Томская область, Россия). Поскольку письменных свидетельств о данной цивилизации не имеется, представления об их мировоззрении реконструированы по обнаруженным фигурам, а также мифам, общим для народов Сибири.

Раздел I

Века первая.

Восток Франции. Дижон. 1721 год. Среди местных жителей распространяется болезнь *charbon malin* (фр. «злокачественный уголь»), характеризующаяся некротическими поражениями кожи. Вернувшийся туда с ликвидации Марсельской чумы (1720–1722) Николя Фурнье¹, вдохновлённый своими недавними успехами, приступает к изучению заболевания, поскольку его старшие коллеги не смогли добиться заметных успехов. Однако и его ожидает фиаско. Видя, что, как и в Марселе, кожа больных покрывается тёмными пятнами некроза, он понимает, что при схожести столь важного симптома эта болезнь иная, и её не вылечить теми методами, что казались эффективными при чуме. Отчаянно пытаясь найти ответ на эту медицинскую проблему, к 1727 году он доходит до самого юга Франции, до одной из деревень близ Монпелье, где местные жители так сильно страшатся *charbon malin*, что изолируют даже единственного больного, не выпуская его вплоть до самой смерти.

Наблюдая там за течением заболевания и придя к пониманию, что изучаемая им болезнь является целым спектром «состояний», Фурнье предпринимает первые попытки её классификации². В отличие от своих коллег и предшественников, основывавшихся на клинических симптомах, к составлению классификации он подходит как эпидемиолог, взяв за основу способы приобретения болезни. Итак, он разделяет *charbon malin* на две основные формы: спонтанную и контактно-заразную. Первая является чисто профессиональным заболеванием, обычно поражающим крестьян, работающих в полях под палящим солнцем (поскольку её проявления были в основном летом), дышащих «гнилостными испарениями» земли, употребляющих в пищу плохую воду и ходящих в грязной одежде.

¹ Nicolas Fournier (1700–1781), французский врач.

² Fournier N. *Observations et expériences sur le charbon malin, avec une méthode assurée de la guérir*. Dijon: Defay, 1769. Здесь и далее при упоминании важного открытия или опыта будет приведена ссылка на соответствующую публикацию, чтобы каждый при желании мог с ней ознакомиться. Для удобства восприятия она приводится другим шрифтом.

Вторая же возникает в случае прикосновения или употребления в пищу мяса, шерсти или шкур больных животных и находит своё выражение в двух клинических состояниях: единичное кожное поражение, как правило, не приводящее к тяжёлым последствиям, и «внутреннее» поражение, характеризующееся фульминантным (скоротечным) течением, часто фатальным.

Конечно, эта классификация далека от истины, но нужно понимать, что всё описываемое происходит в «домикробную» эру, когда знания о возбудителях инфекционных болезней ограничиваются лишь выводами Джироламо Фракасторо¹. Поначалу классификация Фурнье не была должным образом воспринята современниками, но оказалась полезной уже в 1770 году, когда после страшного землетрясения во французской колонии Сан-Доминго (современный Гаити) начался падеж крупного рогатого скота. Мишель-Пласид Жюстен² так описывает эти события: *«Несчастные рабы на севере Сан-Доминго испытывали самый ужасный голод... Треска была полностью недоступна, а испанцы, чьи скотоводческие ранчо или пастбища ежедневно редели из-за ужасной эпизоотии, пытались солить или коптить мясо своих несчастных больных или мёртвых животных, чтобы иметь возможность продавать его во французские заведения. Это мясо, известное в колониях как tassau, обычно избегаемое для употребления в пищу рабами, распространяло на них заразный агент, которым мясо было заражено. Форма этого заболевания, именуемого charbon, распространилась по всем соседним жилищам испанцев, а также там, где рабы получали tassau. В течение шести недель более 15 тысяч белых колонистов и рабов погибло от этой ужасной болезни... Но многочисленные и быстрые смерти, вызванные болезнью, были ещё не всем: по меньшей мере 15 тысяч рабов умерли от голода...»*

Через четыре года крупная эпизоотия происходит на французских островах Гваделупа. В своём отчёте о её расследовании Анри

¹ Girolamo Fracastoro, Fracastorius, 1478–1553; венецианский врач, писатель, математик, астроном. Автор учения о «контагиях», т. е. заразительных началах (семенах), являющихся этиологическими агентами инфекционных заболеваний; противопоставлялось учению о «миазмах», но не было популярным в медицинской науке вплоть до середины XIX века.

² Michel-Placide Justin, 1801–1857; французский историк, литератор, ресторатор.

Бертен¹ сообщает, что некротические поражения на руках и предплечьях, вызванные *charbon malin*, появляются лишь у тех рабов, которые вскрывают туши животных или ставят им клизмы². «Кишечные» формы, приводящие к летальным исходам, бывают только у тех, кто употребляет мясо больных животных в пищу. Не будучи врачом, он, однако, проводит вскрытия трупов людей и животных, отмечая сходство кишечных поражений и тем самым доказывая прямую возможность заражения человека от животных, при этом утверждая невозможность заражения человека от человека.

Его наблюдения подтвердятся в том же году, когда болезнь снова вернётся в Сан-Доминго, поразив в этот раз уже не только крупный рогатый скот, но даже коз, овец, свиней, собак и кошек. И снова многие рабы погибнут, но будут сделаны выводы о необходимости создания системы эпидемиологического надзора, что будет воплощено в жизнь в 1776 году Феликсом Вик-д'Азиром³. Несмотря на все жизненные перипетии, этот гениальный человек смог объединить талантливых специалистов своего времени, интересовавшихся инфекционными заболеваниями животных и человека, вероятно, создав первую в мире национальную санитарную службу, состоящую из разветвлённой сети учреждений⁴.

Уже в 1780 году Академия наук Дижона объявляет конкурс на лучший труд по причинам и лечению *charbon malin*. Лучшей признаётся работа⁵ Жа́на-Франсуа́ Томасе́на⁶, в которой он собрал и

¹ Henri-Léonard-Jean-Baptiste Bertin, 1720–1792; французский юрист, адвокат. Министр иностранных дел (1774). Генеральный контролёр финансов (1759–1763). Его трудами в Лионе была создана первая во Франции Ветеринарная школа (1762).

² Распространённый в то время способ лечения ветеринарных заболеваний, включающий глубокое введение руки в прямую кишку животного.

³ Félix Vicq-d'Azyr, 1746–1794; французский врач, анатом, пионер в области сравнительной анатомии. Член Французской академии наук (1774). Последний врач королевы Марии-Антуанетты (1755–1793). Обнаружил и дал описание чёрной субстанции (Substantia nigra) среднего мозга.

⁴ Официально просуществовала до провозглашения Первой французской республики в сентябре 1792 года, когда была ликвидирована как часть старого, монархического, мира. Однако сама идея, в той или иной её реализации, продолжила жить.

⁵ Thomassin J.-F. *Dissertation sur le charbon malin de la Bourgogne, ou la pustule maligne*. Dijon: Antoine Benoît, 1780.

⁶ Jean-François Thomassin, 1750–1828; французский военный хирург.

систематизировал информацию о вспышках за несколько десятилетий. Именно эта работа побудит Филибера Шабэра¹ в том же году написать собственный труд², в котором, рассматривая *charbon malin* исключительно с ветеринарной точки зрения, он разделит заболевание уже на три формы: основную (кожную), симптоматическую (системную) и внутреннюю (желудочно-кишечную).

Описанные события достаточно быстро привлекли внимание европейских стран к проблеме ветеринарных заболеваний и, в частности, *charbon malin*, что способствовало изучению заболевания в различных странах.

Веха вторая.

В июне 1850 года на Монмартре за десять лет до того, как сей знаменитый холм стал частью не менее знаменитого Парижа, овцы умирали от *sang de rate* (фр. «кровь селезёнки»). Инспектор местной скотобойни, господин Коллиньон, передаёт Пьеру Райе³ селезёнку больной овцы, забитой несколькими часами ранее, из которой последний отбирает кровь и при помощи ланцета прививает подкожно здоровой овце. В первые сутки ничего особенного не наблюдается, во вторые, как напишет⁴ сам экспериментатор, животное «выглядит грустным, но продолжает питаться», а на третьи сутки у него пропадает аппетит, учащается дыхание, появляются жар и слабость (только применение грубой силы вынуждает овцу встать). Вместе с тем места инъекций не имеют никаких признаков воспаления, только из ноздрей течёт жидкость. К утру четвёртого дня дыхание становится ещё интенсивнее, животное сильно подавлено и совершенно отказывается двигаться. Около полудня после непродолжительных конвульсий оно умирает. Шерсть около острижен-

¹ Filibert Chabert, 1737–1814; французский ветеринарный врач, писатель, агроном.

² Chabert P. *Description et traitement du charbon dans les animaux*. Paris: Imprimerie royale, 1780

³ Pierre François Olive Rayer, 1793–1867; французский врач, дерматолог. Член Французской Академии наук (1843). Автор многочисленных работ по медицине. Лейб-медик короля Луи-Филиппа (1773–1850) и императора Наполеона III (1808–1873).

⁴ Rayer M. *Inoculation du sang de rate*. Comptes rendus des séances et mémoires de la Société de Biologie. 1850; 2:141–144.

ных мест инъекций имеет фиолетовый оттенок, который вскоре после смерти исчезает.

Предыдущим летом на фермах в Босе, расположенных к югу от Шартра, Пьер Райе и его ученик Казимир Давен¹ уже изучали эту болезнь и проводили похожий опыт. До них, в 1823 году, его проводил Элой Бартеlemi². Привитая им овца была найдена мёртвой через 60 часов после заражения. Её селезёнка была больше и имела более глубокие повреждения, нежели селезёнка овцы, использованная в качестве материала для заражения. Привитая этой селезёнкой овца умерла уже через 30 часов...

Однако в этот раз Райе не интересовало время смерти. При вскрытии овцы он обнаружил, что места инъекций затянулись, а ближайшие к ним лимфатические узлы, хотя и были красноватого цвета, заметно не увеличились. Введённые ланцетом сгустки крови не рассосались и имели пурпурно-винный оттенок. В желудке сохранилось много непереваренной пищи, печень и поджелудочная были без изменений, поверхность лёгких была усеяна множеством петехий и гематом. Селезёнка не была заметно увеличена, но её ткань, не имевшая видимых кровоизлияний, была заметно размячена и легко превращалась в кашу (как и ткань селезёнки, которой она была привита). Отдельное внимание он уделил крови: *«...Исследованная под микроскопом, [она] вела себя так же, как кровь овцы, заражённой sang de rate, которую использовали для прививки. Эритроциты, вместо того, чтобы оставаться совершенно отчётливыми, как эритроциты здоровой крови, обычно слипались в неправильные массы; в крови были также мелкие нитевидные тельца, примерно в два раза длиннее эритроцита. Эти маленькие тельца не совершали спонтанных движений».*

В 1869 году уже упомянутый Казимир Давен обнаружил³, что кровь больных овец не заразна до тех пор, пока в ней не обнаружи-

¹ Kasimir-Joseph Davaine, 1812–1882; французский врач, физиолог, бактериолог. Член Парижской медицинской академии (1868). Автор работ по микробиологии. Во время Франко-прусской войны (1870–1871) служил военным врачом.

² Éloy Barthélemy, 1783–1850; французский ветеринарный врач.

³ Davaine C. *Recherches sur les infusoires du sang dans la maladie connue sous le nom de sang de rate.* Comptes rendus de l'Académie des Sciences. 1863; 57:220–223; Davaine C. *Nouvelles recherches sur les*

ваются эти загадочные тельца. Кровь, их содержащая, перестаёт быть заразной, только если пять минут её подогреть на 55 °С, однако, будучи высушенной, она способна сохранить свой заразный потенциал до одиннадцати месяцев даже при нагревании до 100 °С! Примерно в это же время он установил¹ инкубационный период заболевания (26–53 часа) и что кровь от животных, подвергшихся разложению, вызывает другую болезнь, хотя и не смог выделить её возбудителя.

Надо сказать, что ещё в 1838 году Онезím Делэфон² видел в крови крупного рогатого скота, павшего от *sang de rate*, некие «*маленькие палочки*», но он не придал им никакого значения³, тогда как Давен, впечатлённый статьями Луи Пастёра⁴, пришёл к пониманию их заразной природы и, дав им название *bacteria*, утверждал: именно они являются причиной *sang de rate*.

Вместе с тем теория Давена встретила определённое сопротивление в научных кругах. Некоторые исследователи утверждали, что в крови умерших после заражения животных не обнаруживается никаких телец или палочек; другие, наоборот, заявляли, что свободная от них кровь способна передавать *sang de rate*. Кроме того, его теория не объясняла эндемической связи заболевания с «влаж-

infusoires du sang dans la maladie connue sous le nom de sang de rate. Comptes rendus de l'Académie des Sciences. 1863; 57:351–353, 386–387.

¹ Davaine C. *Expériences relatives à la durée de l'incubation des maladies charbonneuses et à la quantité de virus nécessaire à la transmission de la maladie*. Bulletin de l'Académie impériale de Médecine. 1868; 33:816–821.

² Henri-Mamert-Onésime Delafond, 1805–1861; французский ветеринарный врач. Директор (1860–1861) Ветеринарной школы Альфор. Автор работ по заболеваниям рогатого скота.

³ Немецкий врач Алойс Поллендер (Aloys Pollender, 1799–1879) в своей статье 1855 года писал, что видел эти палочки у больных ещё в 1941 году, но ограничил свои исследования изучением поведения клеток крови из-за ограничений в реактивах (см. Pollender A. *Mikroskopische und mikrochemische Untersuchung des Milzbrandblutes, so wie über Wesen und Kur des Milzbrandes*. Vierteljahrsschrift für gerichtliche und öffentliche Medicin. 1855; 8:103–114). Чуть позже их описал немецкий ветеринарный врач Фридрих Брауэль (Friedrich August Brauell, 1807–1882) в своей статье 1857 года (см. Brauell F. A. *Versuche und Untersuchungen betreffend den Milzbrand des Menschen und der Thiere*. Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin. Neue Folge. 1857; 11:132–144).

⁴ Louis Pasteur, 1822–1895; французский химик, один из основателей бактериологии. Член Французской академии (1881). Автор многочисленных работ по микробиологии, вакцинологии, иммунологии и кристаллографии. Соавтор первой вакцины против куриной холеры.

ными» годами и с влажными почвами, такими как долины рек, окрестности болот и озёр, что укрепляло представления о «миазмной»¹ этиологии заболевания.

Века третья.

29 апреля 1876 года. Вздвывая придорожную пыль, дилижанс² из прусского Вольштейна везёт малоизвестного сельского врача Роберта Коха³ в Бреслау⁴, где в одноимённом университете⁵ его ждут профессор ботаники Фердинанд Конх⁶ и заведующий кафедрой патологии Юлиус Конхейм⁷, чтобы заслушать и увидеть результаты его исследований. Сама по себе эта встреча является большой удачей, поэтому наш герой немного нервничает, крепче прижимая ящики с многочисленными склянками, пипетками, мерными цилиндрами, колбами Эрленмейера⁸ и мензурками. Тут же его микроскоп, питательные среды и сосуды для культивирования, а также клетки с лабораторными животными...

В стенах университета под пристальными взглядами почтенных учёных мужей он шаг за шагом повторяет проделанные много раз

¹ Теория о распространении инфекционных болезней через «плохой воздух», возникший в результате гниения, чаще всего на болотах. Господствовала в медицине вплоть до открытия патогенных микроорганизмов в конце XIX века.

² От фр. *carosse de diligence* – «проворный экипаж»; многоместная карета на конной тяге, являющаяся средством междугороднего передвижения до распространения паровозов.

³ Robert Koch, 1843–1910; прусский (немецкий) врач, один из основателей бактериологии. Член Прусской академии наук (1904). Первооткрыватель возбудителя туберкулёза (*Mycobacterium tuberculosis*) и печально известной псевдовакцины «туберкулин».

⁴ Ныне города Вольштын и Вроцлав в Польше.

⁵ Ныне Вроцлавский университет в Польше.

⁶ Ferdinand Julius Cohn, 1828–1898; прусский (германский) ботаник, бактериолог. Член Германской академии естествоиспытателей «Леопольдина» (1849). Автор научных трудов по морфологии и систематике бактерий, водорослей и грибов.

⁷ Julius Friedrich Cohnheim, 1839–1884; прусский (германский) врач еврейского происхождения, патологоанатом, патофизиолог. Автор работ о воспалении. Высказал гипотезу о том, что раковые опухоли развиваются из «невостребованных» во время эмбриогенеза клеток.

⁸ Коническая колба, созданная в 1861 году прусским (германским) химиком Эмилом Эрленмейером (Emil Erlenmeyer, 1825–1909).

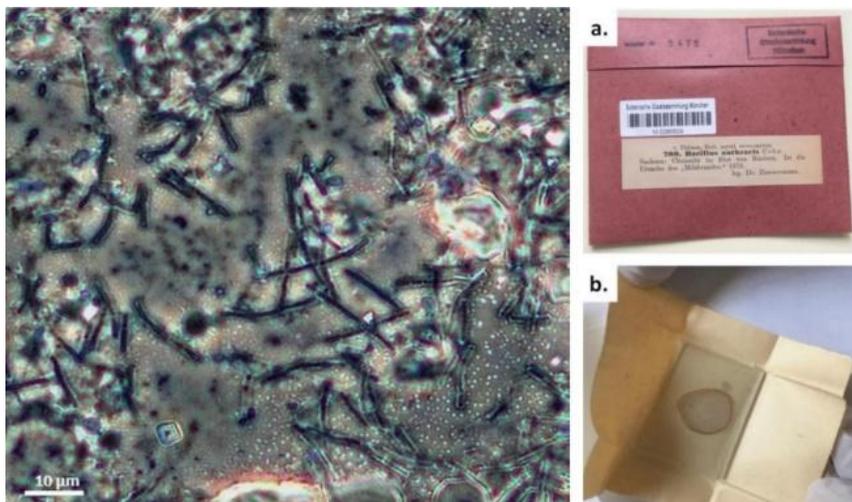
эксперименты: берёт мышь и прививает ей селезёнку человека, умершего от *Milzbrand* (нем. «огонь селезёнки»). «Сначала я делал прививку в ушки или середину хвоста, – пишет¹ Кох, – но нашёл эти методы небезопасными, так как животные могут удалить прививочный материал путём растирания или облизывания. Позже местом прививки я выбрал заднюю часть основания хвоста, где кожа уже подвижна и покрыта длинной шерстью. Для этой цели используется мышь, сидящая в большом стакане, накрытом крышкой, удерживаемая за хвост длинным пинцетом. Хвост выдёргивается из узкой щели между крышкой и краем стакана до такой степени, что можно сделать неглубокий поперечный надрез на коже»².

Селезёнка заражённой мыши обнаруживается значительно раздутой и наполненной «бесчисленным количеством кристалльно чистых палочек», которые, хотя и в меньшем количестве, также обнаруживаются в крови. Опытным путём Кох установил, что количество этих палочек в крови зависит от вида животного. Так, в крови морских свинок их количество равно или превышает количество эритроцитов, а в крови кроликов их значительно меньше. В крови же мышей их настолько мало, «что иногда кажется, будто их вовсе нет», и именно этим объясняется то, что оппоненты Казимира Давена умудрялись заражать животных кровью, свободной от этих палочек.

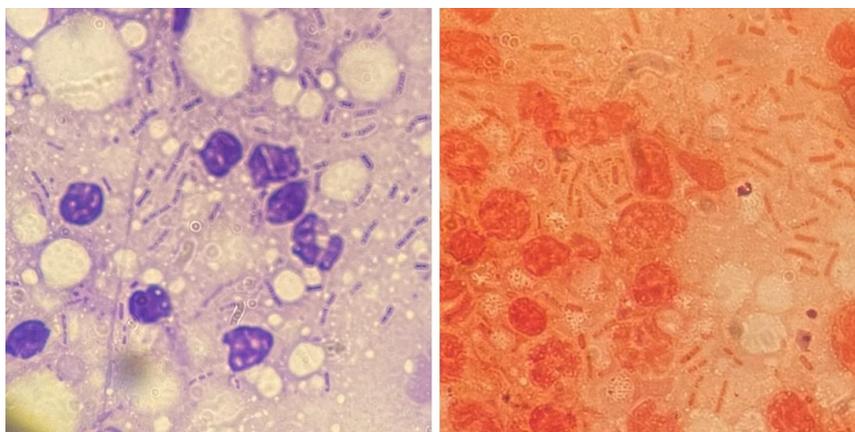
Ранее сообщалось, что они также подвергали сомнению возможность сохранения палочек в крови и указывали на явную сезонность заболевания. Заражая животных последовательно, прививая новой мыши селезёнку предыдущей, Кох пристально изучал выделяемые от них палочки. Он установил, что вопреки сведениям Давена палочки не так устойчивы, и кровь, их содержащая, сохраняет свой заражающий потенциал (инокуляционную способность) «лишь несколько недель в высушенном состоянии и всего несколько дней

¹ Koch R. *Die Ätiologie der Milzbrand-Krankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte des Bacillus Anthracis*, Berlin, 1876, 26 p.

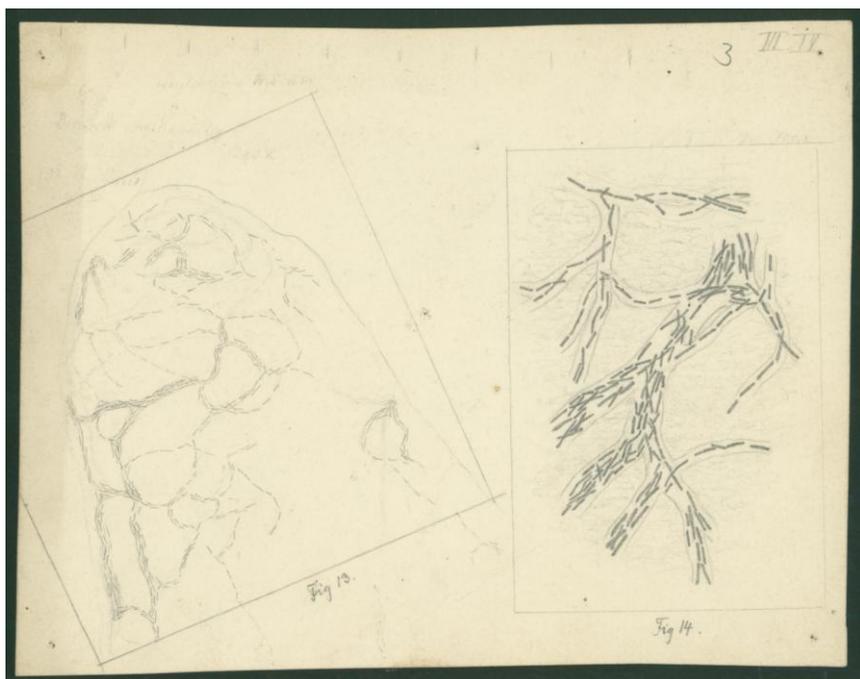
² Сравните приведённое описание с методикой внутривенного заражения лабораторного животного, изложенной в Главе 34 Оперы о чуме (здесь и далее таким образом будут приводиться ссылки на предыдущую книгу: Горшков-Кантакузен В. А. *Опера о чуме*. М.: Издательство Московского университета, 2024, 616 с. ISBN 978–5–19–012018–9; 978–19–012017–2; англоязычная версия: Gorshkov-Cantacuzene V. A. *The Opera on the Plague*, 2024, 572 p. ISBN 979–8–3507–3905–3).



Микрофотография мазка крови животного (слева), умершего в Хемнице (Германия) в 1878 году (слева любезно предоставлено Dr. Gregor Grass; справа по Braun P., 2020). Препарат (а – общий вид конверта, б – вид препарата) был изготовлен через два года после того, как Роберт Кох выделил чистую культуру возбудителя, и, хотя он значительно пострадал от времени, мы можем видеть, какие бактерии видели Онезим Делэфон, Пьер Райе и Казимир Давен



Мазки-отпечатки селезёнки животного, на которых наблюдаются «палочки» в капсуле; окраска генцианвиолетом (слева) и эозином (справа). Конечно, Онезим Делэфон, Пьер Райе, Казимир Давен, Аллойс Поллендер и Роберт Кох исследовали неокрашенные препараты, поэтому остаётся лишь восхищаться их наблюдательностью



*Рисунок Роберта Коха, изображающий увиденные им кристалльно чистые палочки в селезёнке
(любезно предоставлено Robert-Koch-Institut)*

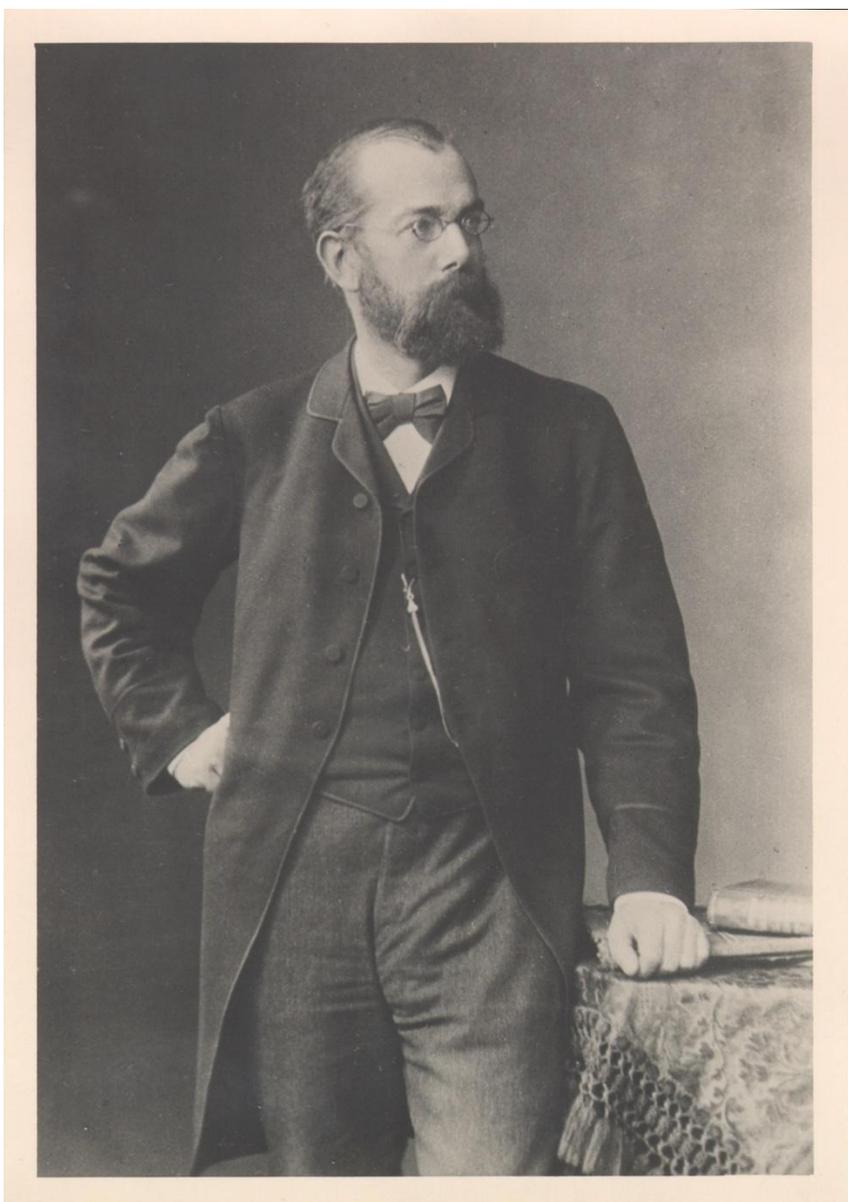
во влажном».

Внимательному читателю уже наверняка на ум пришёл вопрос, которым задался и Кох: так как же такие скоропортящиеся микроорганизмы могли стать возбудителями заболевания, которое часто дремлет всю зиму и, возможно, годами во влажной почве? Ответ на этот вопрос предложил уже упомянутый Фердинанд Кох: палочки могут переходить в состояние спор, сохраняться в таком виде продолжительное время и затем снова «превращаться» в палочки (вегетативные клетки). «Все мои дальнейшие попытки, – пишет Кох, – были направлены на обнаружение этого предполагаемого состояния... После многих безуспешных усилий наконец удалось достичь этих целей и таким образом определить истинную этиологию заболевания», вызываемого бактериями, отнесёнными¹ Фердинандом Коном к роду *Bacillus* и именуемыми *Bacillus anthracis*, как называем их мы вплоть до сего дня; заболевания, которое в различных местах носило названия *Milzbrand*, *charbon malin*, *sang de rate*, *anthrax* (др.-греч. «уголь»), *la maladie de Bradford* (фр. «болезнь Бредфорда»), *Cumberland disease* (англ. «болезнь Кимберленда»), *болезнь сортировщиков шерсти*, *карбункул злокачественный* и, наконец, *сибирская язва*.

К настоящему времени она всё ещё остаётся особо опасной болезнью, передающейся от животных к человеку и распространённой в регионах с развитым скотоводством. Её возбудитель, спорообразующая бактерия *Bacillus anthracis*, способна долгое время сохраняться в окружающей среде, создавая постоянную угрозу возникновения новых вспышек.

Дабы достоверно доказать, что бактерии *B. anthracis* способны переходить от палочкообразной формы в споровую и обратно, наш пока ещё мало кому известный экспериментатор Роберт Кох про-

¹ Cohn F. J. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen*, Bd. II, Heft 2, Breslau: J. U. Kerns Verlag, 1876, 277 p.

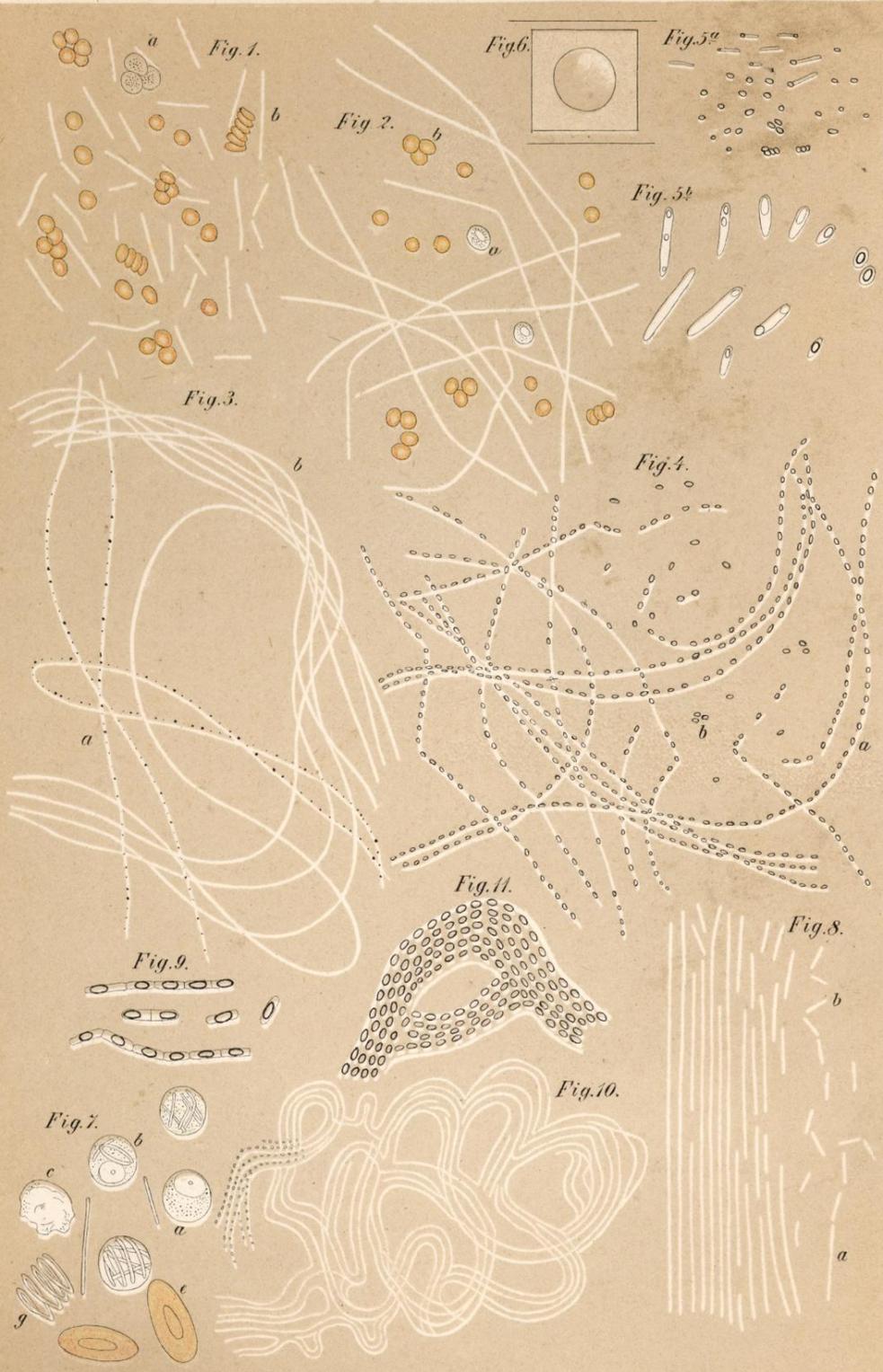


Роберт Кох
(любезно предоставлено Robert-Koch-Institut)

водит следующий эксперимент. На предметное стекло он наносит каплю свежей бычьей крови, к которой добавляет небольшой кусочек гомогенизата (т. е. однородной массы) селезёнки, содержащей бактерии, и сверху накрывает покровным стеклом так, чтобы гомогенизат размещался примерно посередине. Во избежание высыхания препарат помещается во влажную камеру¹⁾ и при температуре 35–37 °С инкубируется 15–20 часов.

Кох пишет: *В середине препарата между хорошо сохранившимися клетками крови и селезёнки (Рис. 2.1-Fig.1a,b) всё ещё обнаруживается множество неизменных бацилл (т. е. бактерий), но в меньшем количестве, чем в свежем препарате. Однако, как только стоит выйти из середины препарата, тут же встречаются бациллы, что в 3–8 раз длиннее и имеют небольшие изгибы и искривления (Рис. 2.1-Fig.2). Чем ближе подходишь к краю, тем более длинные нити обнаруживаются, многократно перекрученные и превосходящие в длине исходные бациллы в сто и более раз (Рис. 2.1-Fig.3). Многие из этих длинных нитей утратили свою однородную структуру и стеклообразный вид, их содержимое мелко гранулировано, а местами через равные промежутки встречаются мелкие светопреломляющие гранулы (Рис. 2.1-Fig.3a). Их развитие наиболее интенсивно в нитях, расположенных ближе к краю, что, вероятно, более благоприятно для них с точки зрения газообмена в жидком препарате. Они содержат полностью сформировавшиеся споры, внедрённые в вещество нитей в виде несколько вытянутых, круглых, сильно преломляющих свет тел, расположенных через очень короткие регулярные интервалы (Рис. 2.1-Fig.4a). В таком виде эти нити, особенно когда они сгруппированы в многочисленные переплетённые и закрученные линии, представляют собой удивительное зрелище, которое лучше всего сравнить с очень тонкими, искусственно уложенными нитями жемчуга. Некоторые нити уже находятся в процессе распада, и на их преж-*

¹ «Влажность воздуха во влажной камере необходимо регулировать так, чтобы жидкая часть препарата не просачивалась из-под покровного стекла и не высыхала по его краю. В первом случае бациллы вымываются и ускользают от наблюдения, а во втором блокируются сухим поверхностным слоем, что предотвращает их дальнейшее развитие... Для влажной камеры я использовал плоские тарелки (чашки Петри будут изобретены только через 10 лет. – *Примеч. автора*), наполненные мокрым песком, а его поверхность устилал фильтровальной бумагой. Тарелка накрывалась стеклянной пластиной. Если слой песка настолько высок, что расстояние между поверхностью образцов и нижней стороной стеклянной пластинки составляет 0,5–1 см, то образцы остаются достаточно влажными» Роберт Кох.



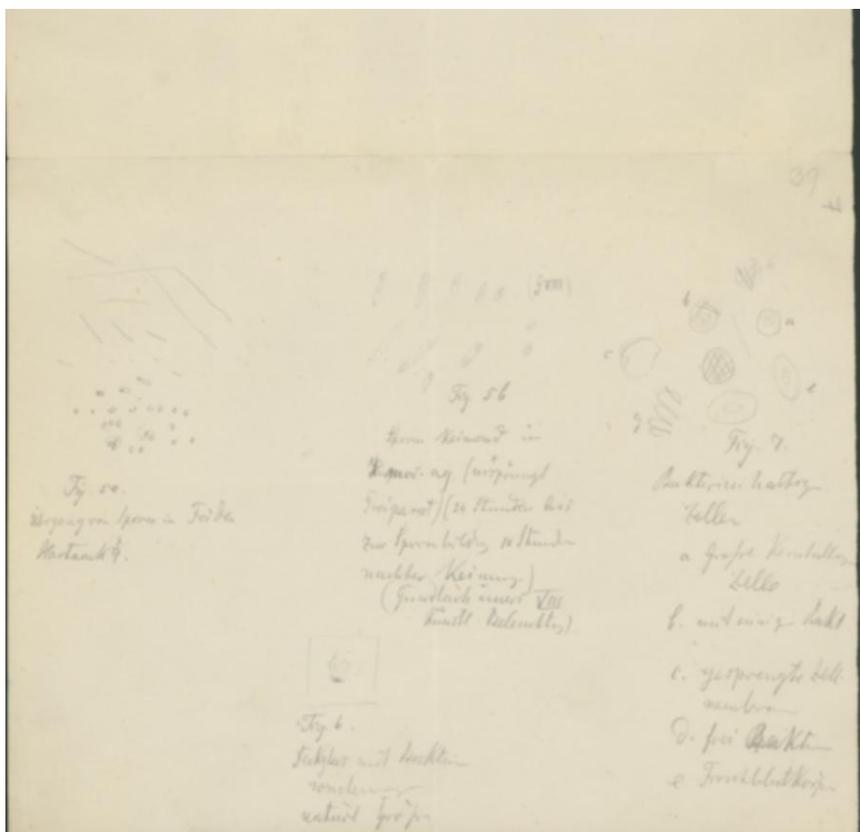


Рисунок Роберта Коха (черновик к статье), изображающий некоторые иллюстрации с **Рис. 2.1** (любезно предоставлено Robert-Koch-Institut)

◀ **Рис. 2.1.** Иллюстрации опытов Роберта Коха, опубликованные им в статье (по Koch R., 1876): Fig. 1 – бактерии из крови морской свинки, имеющие вид стекловидных палочек (a), некоторые из которых начинают ветвиться и изгибаться (b); Fig. 2 – бактерии из селезёнки мыши после трёхчасового культивирования в капле чистой водянистой влаги (*hinter aquosus*) бычьей камеры глаза; Fig. 3 – бактерии из Fig. 2 после 10 часов культивирования; Fig. 4 – бактерии из Fig. 2 после 24 часов культивирования; Fig. 5 – прорастание спор; Fig. 6 – предметное стекло, на котором «глазами вы можете увидеть слегка плавающие, чрезвычайно тонкие массы нитей, вросшие в каплю от места посева»; Fig. 7 – результат помещения фрагмента заражённой селезёнки мыши под кожу спины лягушки (a – крупные ядросодержащие бактерии, b – короткие, слегка изогнутые бактерии, объединённые в гроздь и закрученные по спирали, которые продолжают расти и развиваться в клетках, разрывая их; c – разрушение клеточных мембран, g – высвобождение бактерий, e – клетки крови лягушки); Fig. 8–11 – не подписаны автором; Fig.11 запечатлён процесс споруляции

ную форму указывает лишь расположение спор, все ещё скреплённых вместе слизистым связующим веществом. А кое-где уже встречаются отдельные споры или небольшие скопления слипшихся (агломерированных) спор (**Рис. 2.1-Fig.4a**).

Несмотря на такую красоту, полученную в одном препарате, и множественные повторения этого эксперимента, всё ещё нельзя исключать вероятность контаминации препарата бактериями из воздуха, ибо «каким образом бациллы, – пишет Кох, – у которых я ранее не замечал никакого самостоятельного движения, смогли добраться до края препарата, тогда как клетки крови остались в его середине?».

Для ответа на этот вопрос он конструирует прибор, состоящий из нагреваемого керосиновой лампой до 40 °С предметного столика¹, на котором размещается полое предметное стекло, накрытое покровным стеклом (**Рис. 2.1-Fig.6**), а сверху водружается микроскоп. На нижнюю сторону покровного стекла помещается капля чистой водянистой влаги (*humor aquosus*) бычьей камеры глаза, в край которой вносится немного свежего гомогенизата селезёнки, содержащего бактерии, после чего покровное стекло помещают на предметное, покрытое маслом, а затем весь препарат фиксируют на предметном столике и каждые 10–20 минут с помощью микроскопа делают зарисовки.

Кох пишет: Сначала бациллы несколько уплотнились и как бы набухли, но почти не изменялись в течение первых 2 часов. Затем они начали расти. Через 3–4 часа они уже достигли длины в 10–20 раз больше первоначальной, начали изгибаться, вытеснять друг друга или сплетаться в косичку. Ещё через несколько часов отдельные нити стали настолько длинны, что не помещались в одно поле зрения. Они напоминали ворох стеклянных нитей, которые на манер лиан соединяются разнообразными способами, то образуя длинные параллельные пряди, то образуя чрезвычайно тонкие спирально закрученные пучки неправильной формы. Если непрерывно наблюдать за свободным концом нити в течение длительного времени, например, минут 15 или 20, то можно легко заметить непрерывное удлинение нити и, таким образом, стать свидетелем странного зрелища видимого роста бацилл и удивиться в их

¹ Для точного определения температуры Роберт Кох использовал каплю говяжьего жира, расплавляющегося при данной температуре.

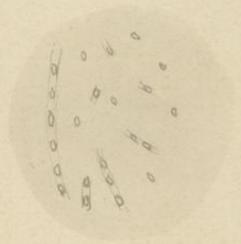
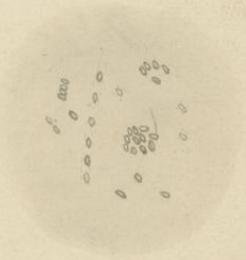
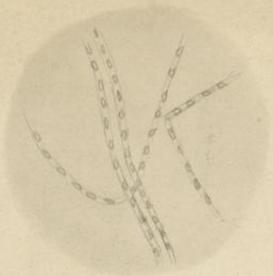
дальнейшем развитии. Уже через 10–15 часов содержимое самых сильных и пышно разросшихся нитей становится мелко гранулированным и вскоре через равные промежутки отделяются очень мелкие, матово блестящие гранулы, которые ещё через несколько часов увеличиваются и образуют сильно преломляющие свет споры. Постепенно нити рвутся и крошатся на концах, споры становятся свободными и, следуя закону гравитации, опускаются в нижние слои капли, где скапливаются в плотные кучки. В таком состоянии препарат остаётся в течение нескольких недель.

Конечно, описанное Кох видел не в одном препарате, а в многочисленной серии опытов, но он наглядно продемонстрировал возможность споруляции (т. е. спорообразования) вегетативной клетки возбудителя сибирской язвы¹ под действием таких факторов, как обеднение питательной среды (в результате культивирования бактерии потребляли питательные вещества из субстрата), действие растворённого кислорода, которого с краю препарата было больше, чем посередине, а также сниженное содержание углекислого газа². Другими немаловажными факторами являются температура и наличие солнечного света. О первой Кох сообщает, что спорообразование возможно при температурах от 12 до 45 °С, но наилучшее спорообразование возможно при 35 °С. О влиянии света он ничего не сообщает, но можно предположить, что, поскольку свои опыты Кох проводил дома, в одной из комнат, переделанной под лабораторию, солнечного света в помещении было достаточно³.

¹ Поскольку речь идёт о клетках, обнаруженных в тканях заражённых животных, с высокой долей вероятности можно утверждать, что Кох видел капсульную форму. Конечно, он мог работать с редкими бескапсульными штаммами, однако он также сообщает, что наблюдал «очень мелкие матово блестящие гранулы». Таким образом, Кох видел не просто процесс перехода вегетативной клетки в спору, а последовательность: капсульная форма – вегетативная форма – размножение цепочками – капсульная форма – споруляция.

² Имеются сведения, что изменение концентрации кислорода не так сильно влияет на возможность споруляции, как концентрация CO₂, возрастание которой значительно затрудняет этот процесс (см. *Infection disease of animals, disease due to bacteria, Vol.1, Ed.: Stableforth A. W., Galloway I. A., London: Butterworth, 1959*).

³ Для улучшения споруляции в практической работе некоторые специалисты предпочитают выставлять посуду с выращенной культурой (чашки и флаконы) на поверхности, обеспечивающие попадание прямых солнечных лучей. Однако не следует при этом забывать о правилах биологической безопасности.



◀ Рисунок Роберта Коха, изображающий полный цикл развития сибиреязвенного микроба (любезно предоставлено Robert-Koch-Institut). Поскольку цикл развития представлен не по порядку, можно предположить, что это зарисовки, сделанные во время серии экспериментов.

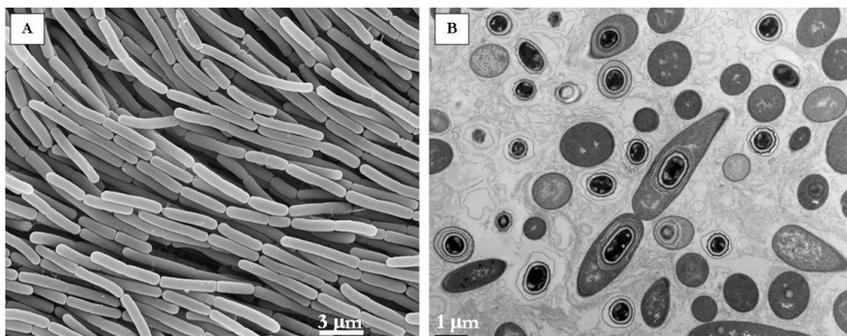
1	2	3
4	5	6
7	8	9
10	11	12

(1) Процесс образования споры у полиса материнской клетки. Чаще всего такое можно наблюдать у капсулированных вегетативных клеток, извлечённых из тканей животных. (2) Споруляция при культивировании на обильном субстрате при попадании солнечного света и кислорода. (3) То же, что и (2), но культура на 12 часов моложе. (4) и (7) Пустые области. (5) и (8) Тяжи бактериальной культуры (такие же тяжи можно наблюдать после обработки вегетативных клеток формалином). (6) и (9) Споруляция, идущая от края к центру. Обратите внимание, что крайние клетки Кох изобразил жирнее, что может свидетельствовать об их гибели, поскольку в препаратах мёртвые споры всегда выглядят темнее и чётче. (10–12) Различные бактерии, вероятно, тетракокки (10), актиномицеты (11) и спорообразующие бациллы (13)

Принято считать, что споровая форма является механизмом выживания, при котором бактерия, способная переходить в эту форму, «впадает в спячку» на время неблагоприятных условий, сохраняясь таким образом в окружающей среде в течение длительного времени. Однако применительно к *B. anthracis* и его ближайшим родственникам (*B. cereus*, *B. thuringiensis*) это утверждение следует расширить: показано, что возбудитель может присутствовать в почве и в вегетативной форме, поэтому можно предположить, что споруляция не только является формой защиты, но и повышает вероятность распространения (за счёт формирования жгутика на поверхности).

Процесс образования эндоспоры (называемой чаще для краткости просто «спора»; **Рис. 2.2**), длящийся примерно 8 часов, начинается с «решения о споруляции» – сложного механизма химических сигналов, который до конца ещё не изучен, – после которого бактериальная клетка начинает асимметрично делиться¹ на две сестринские клетки, отделённые друг от друга септой (перегородкой) и содержащие копии генома. Меньшую клетку принято называть преспора, а большую – материнская клетка. Последняя инициирует процесс миграции и слияния клеточных стенок по механизму, напоминающему фагоцитоз, посредством которого она через септу

¹ То есть ближе к одному из полюсов клетки, а не посередине.



*Вегетативные клетки *B. anthracis*, сгруппированные в цепочки (А), и единичные, формирующие споры (В); сканирующая (А) и трансмиссионная (В) электронная микроскопия (изображения Muhsin Özel и Gudrun Holland (А), Lars Möller и Josef Schröder (В)); любезно предоставлено Robert-Koch-Institut). Сравните эти изображения с тем, что видел Роберт Кох*

поглощает преспору, ядро которой теряет до 80 % влаги (обезвоживается). На поверхности ядра преспоры оказывается два плотно прилегающих слоя пептидогликана – внутренний (собственный) и внешний, доставшийся от материнской клетки. При этом внешний пептидогликан утолщается, образуя **кору (cortex)**, тогда как внутренний, напротив, истончается до тонкой прослойки между ядром и корой, чтобы в будущем, в процессе прорастания споры, стать основой для клеточной стенки вегетативной клетки.

Надо сказать, что процесс «сборки» споры из преспоры в основном регулируется генами материнской клетки, чья транскрипция, как и транскрипция любого белка клетки, инициируется специальными белками, именуемыми сигма-фактор (σ -фактор), обеспечивающими связывание ДНК-зависимой РНК-полимеразы с промоторной областью ДНК. Так, фактор σ^E материнской клетки инициирует работу целого каскада генов, что в частности приводит к синтезу белка SpoIVA. Этот белок, изначально локализующийся вблизи септы со стороны материнской клетки (или непосредственно на ней), после поглощения материнской клеткой преспоры мигрирует на поверхность коры, где с другими белками вокруг неё образует **белковую оболочку (coat)**. При этом прикрепление SpoIVA к поверхности септы обеспечивается взаимодействием с

белками SpoVM⁽¹⁾ и SafA, поскольку клетки, не способные синтезировать первый белок (их называют мутантными), образуют тонкую, слабо прикреплённую оболочку, а не способные синтезировать второй – оболочку, склонную к отслаиванию. Интересно, что оболочки близких родственников *B. anthracis*



Рис. 2.2. Ультратонкий срез споры *B. anthracis*; трансмиссионная электронная микроскопия (по Stewart G. C., 2015; публикуется по лицензии the American Society for Microbiology; разрешение передано через the Copyright Clearance Center, Inc.)

варьируются по толщине, и, в частности, у сенной палочки (*B. subtilis*) она значительно толще и не такая компактная.

Сборка оболочки начинается с создания предоболочки («подложки»), состав которой пока неизвестен. Процесс регулируется факторами σ^E и σ^K материнской клетки, причём активация последнего требует сигнала, генерируемого в преспоре под контролем фактора σ^G , активация которого совпадает с завершением поглощения преспоры материнской клеткой. Затем материал предоболочки преобразуется в её внутренний слой, что происходит одновременно с конструированием внешнего слоя оболочки и контро-

¹ Белок SpoIVA присутствует во всех спорообразующих бактериях, а его C-концевая область высококонсервативна у представителей родов *Bacillus* и *Clostridia*, из чего некоторые исследователи полагают, что механизм зависящего от SpoVM–SpoIVA прикрепления оболочки к поверхности коры преспоры существовал ещё у общего предка этих бактерий (см. Henriques A. O., Moran C. P. *Structure, assembly, and function of the spore surface layers*. Annu Rev Microbiol. 2007: 61:555–588; DOI: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093224).

лируется непосредственно фактором σ^K . Интересно, что локализация белка SpoIVA является предпосылкой для локализации белка CotE, которым ограничена локализация предоболочки и с которого начинается сборка внешнего слоя оболочки (помимо этого минимум 40 % белков внешнего слоя оболочки контролируются этим белком), поэтому по его расположению внутри уже зрелой споры можно понять, откуда начиналась сборка.

Сама по себе оболочка обеспечивает защиту от большого количества химических веществ, в частности ферментов, к которым чувствительна кора, например, лизоциму, действие на кору которого приводит к гидролизу пептидогликана и, как следствие, гибели споры. Кроме того, оболочка устойчива к действию таких окислителей, как диоксид хлора, гипохлорит, озон, пероксинитрит и даже перекись водорода, но в малых концентрациях. Именно поэтому в лаборатории при работе со спорообразующими бактериями для дезинфекции используют именно 6%-ный раствор перекиси водорода. Интересно, что за исключением белка CotA, играющего ведущую роль в защите от перекиси водорода¹, для других белков оболочки прямой роли в обеспечении устойчивости не показано².

Другой важной ролью оболочки является подавление раннего прорастания. Так, споры с неполными оболочками, искусственно изолированные из материнских клеток, нестабильны и прорастают спонтанно. С другой стороны, белки оболочки играют важную роль в «нормальном» прорастании. Так, CwlJ, сборка которого зависит от белка GerQ, контролируемого всё тем же CotE, является литическим ферментом коры, активируемым во время прорастания спор. Другой белок, YcsK (LipC), обладает липолитической активностью. Роль OxdD и CotR ещё не показана, но первый, вероятно, защищает прорастающую в земле спору от действия щавелевой кислоты, вырабатываемой грибовыми гифами, а второй – обеспечивает выживание в активированных макрофагах, поскольку он структурно похож на пататин-подобные фосфолипазы, обеспечивающие выжи-

¹ Этот белок также обеспечивает синтез меланиноподобного тёмно-коричневого фермента у *B. subtilis*, играющего роль в защите от ультрафиолетового излучения.

² Хотя контролируемые CotE белки также не играют роли в устойчивости к лизоциму, мутанты, не способные синтезировать CotE, образуют споры, неустойчивые к лизоциму.

вание и репликацию *Toxoplasma gondii* в активированных макрофагах за счёт подавления выработки азота¹.

Далее происходит сборка следующего слоя, про который Кох писал, что он похож на «шарообразную стекловидную массу, которая выглядит как светлое узкое кольцо, окружающее споры». Через 10 лет, в 1886 году, Карл Флюгге² предложит³ называть этот слой **экзоспориум (exosporium)**⁴.

Экзоспорий, внешне похожий на шар, свободно окружающий оболочку⁵, состоит из базального слоя, к которому крепятся ворсинки, и подповерхностного слоя, также именуемого параспоральным. Базальный слой (Рис. 2.3) имеет форму 2D-кристалла и образован сетью короноподобных структур (чашечек), состоящих из α -спиралей богатых цистеином белков, преимущественно CotY и ExsY. Дно чашечек местами запечатано, а местами открыто, что обеспечивает полупроницаемый барьер с проходами диаметром около 20 Å (читается: ангстрем) или 0,002 мкм. Таких отверстий вполне достаточно для прохождения низкомолекулярных соединений, но слишком мало для диффузии таких крупных молекул, как белки. На поверхности базального слоя расположены ворсинки из высокоиммуногенных коллагеноподобных фибрилл, состоящих преимущественно из гликопротеина BclA, крепление которого обеспечивают белки ExsFA (VxpB) и ExsFB, однако точное место крепления фибрилл к базальному слою пока неизвестно. BclA содержит коллагеноподобную область, к которой прикреплено множество идентичных пентасахаридов, содержащих антрозу. Этот необычный сахар, не встречающийся у других представителей *Bacillus spp.*, синтезируется генами, активируемыми действием фактора σ^E , прикрепляется рамнозой (поэтому рамноза-отрицательные

¹ Вспомните, чем обеспечивается подавление азота в макрофагах у чумного микроба. Если забыли, то перечитайте Главы 6 и 13 Оперы о чуме.

² Karl Georg Friedrich Wilhelm Flügge, 1847–1923; немецкий (ганноверский) врач, бактериолог, эпидемиолог, гигиенист. Автор работ по воздушно-пылевому и воздушно-капельным путям распространения инфекций. Добился введения социальной гигиены в качестве университетского предмета.

³ Flügge C. *Die Mikroorganismen*, 2nd ed. Leipzig: Verlag F C W Vogel, 1886.

⁴ Отсутствует у многих спорообразующих бактерий.

⁵ У *B. anthracis* и *B. cereus* он располагается примерно в 10–20 нм от поверхности оболочки.

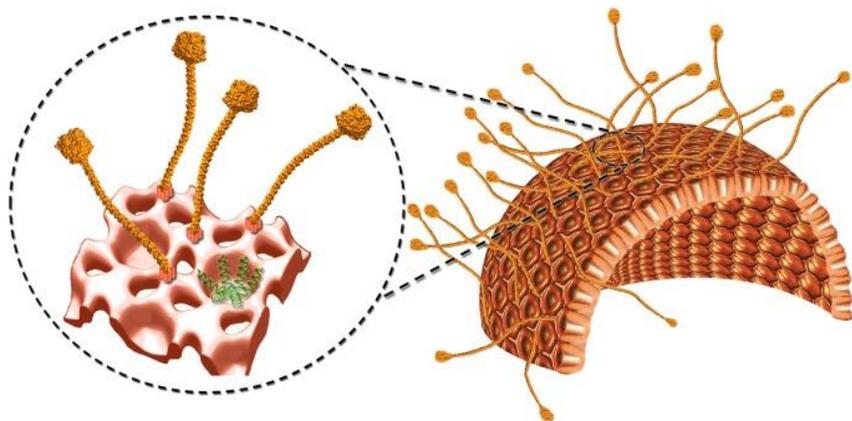


Рис. 2.3. Модель базального слоя экзоспория. Ворс схематически показан прикрепленным к выпуклой поверхности (по Kailas L., 2011; публикуется с разрешения *the National Academy of Science, USA*)

штаммы, соответственно, лишены антрозы) и обеспечивает поддержание конформационной структуры VclA и его устойчивость к протеолизу (т. е. разложению под действием протеаз). Поэтому даже голодающие клетки *B. anthracis* сохраняют способность синтезировать антрозу⁽¹⁾. Вместе с тем, когда антроза расположена экзогенно (транс-антроза), будучи прикрепленной к споре или свободно плавающей на её поверхности, она способствует передаче сигналов, подталкивающих вегетативные клетки к споруляции, и тем самым обеспечивает средство коммуникации между вегетативными клетками⁽²⁾. Похожий на VclA гликопротеин, именуемый VclB, обнаруживается в экзоспории (точная локализация неизвестна) и обеспечивает целостность его структуры, поскольку штаммы, не

¹ Вместе с тем существуют антроза-отрицательные штаммы, имеющие меньшую ворсистость за счёт отсутствия пентасахаридов, прикрепляемых антрозой, а также меньшую скорость прорастания споры.

² Интересно, что остатки сахаров со структурами, очень похожими на антрозу, обнаруживаются в капсуле штамма MR-4, отнесённого к *Shewanella* spp., а также в жгутиках *Pseudomonas syringae* (см. Kubler-Kielb J., Vinogradov E., et al. *Saccharides cross-reactive with Bacillus anthracis spore glycoprotein as an anthrax vaccine component*. PNAS. 2008; 105(25):8709–8712; DOI: 10.1073/pnas.0803897105.). Оба неродственных грамотрицательных микроорганизма встречаются, соответственно, в почвенных и растительных средах, поэтому нельзя исключать их возможное сигнальное взаимодействие со спорами сибиреязвенного микроба.

способные его синтезировать, формируют хрупкий, легко разваливающийся экзоспорий.

Подповерхностный слой чаще всего является фрагментарным и имеется не у всех спор, а его архитектура повторяет архитектуру базального слоя, но с меньшими и более плотно упакованными короноподобными структурами.

Сборка экзоспория начинается сразу же после завершения поглощения преспоры материнской клеткой и активации фактора σ^K , то есть он формируется одновременно с корой и оболочкой. Всё начинается с того, что незадолго до поглощения белок CotY локализуется на септе, поэтому в момент поглощения преспоры материнской клеткой он оказывается на проксимальном полюсе преспоры, наложенным на белок CotE, чья локализация осуществляется с помощью SpoIVA¹. Далее CotE направляет взаимодействие CotY с ExsY (синтезируется поздно, во время окна активности σ^K), что приводит к формированию так называемого проксимального «колпачка» (т. е. ближайшего к клеточной стенке материнской клетки), который как бы по «направляющим» расширяется на всё пространство вокруг оболочки до другого «колпачка», расположенного на противоположном, дистальном, полюсе преспоры (механизм его образования пока неизвестен). Этот механизм ещё называют «крышка с бутылкой». Важно понимать, что построение «направляющих» регулируется CotE, и именно комплексным взаимодействием всех трёх белков во время расширения формируются бороздки, покрывающие поверхность экзоспория ² (Рис. 2.4 – Рис.2.6).

Описанное расширение происходит настолько интенсивно, что «колпачки», лежащие на оболочке, как бы «отрываются» от неё, ввиду чего между экзоспорием и оболочкой образуется пространство. Поскольку среди белка CotE, расположенного в нижнем слое

¹ Именно поэтому штаммы, не способные синтезировать SpoIVA, формируют только фрагменты экзоспория, заполняющие всё пространство материнской клетки.

² Примечательно, что хотя процесс сборки экзоспория у всех близких родственников сибиреязвенного микроба схож, расширение «колпачка» у *B. cereus* происходит разнонаправленно, поскольку «направляющие» как бы спутаны между собой, что, вероятно, и объясняет максимальную прочность экзоспория у этого вида среди близкородственных видов.

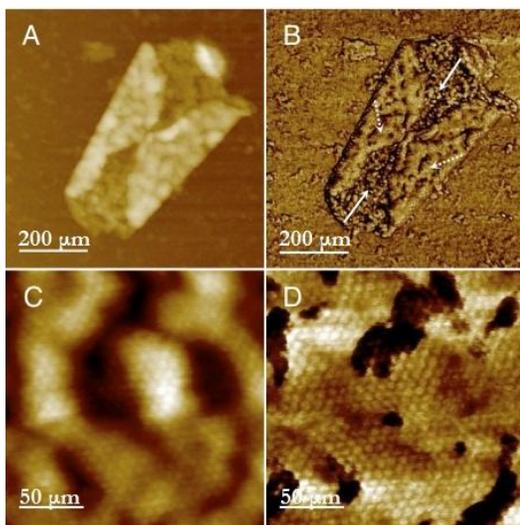
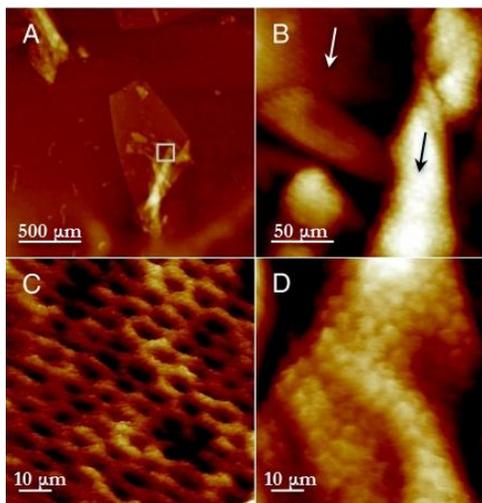


Рис. 2.4. Архитектура поверхности сложного фрагмента экзоспория *V. cereus* (ближайший родственник сибиреязвенного микроба); сканирующая атомно-силовая микроскопия. Обнаруживается две поверхности (A и B) с участками упорядоченной (пунктирные белые стрелочки) и неупорядоченной (сплошные белые стрелочки) кристаллической решётки, которая, по видимому, состоит из массива структур в форме купола. При большей визуализации упорядоченной поверхности (C и D) обнаруживаются шипы из гексагонально плотно упакованных единиц диаметром около 8 мкм. Изменение цвета от тёмного к светлому иллюстрирует изменение высоты от 100 до 10 мкм (по Kailas L., 2011; публикуется с разрешения the National Academy of Science, USA)

Рис. 2.5. Архитектура поверхности экзоспория *V. thuringiensis* (ближайший родственник сибиреязвенного микроба); сканирующая атомно-силовая микроскопия. Обнаруживается кристаллическая решётка, состоящая из гексагонально плотно упакованных вогнутых «чашечек», образующих сотовый узор (C), при этом на противоположной стороне экзоспориума обнаруживается иная кристаллическая решётка (B). Изображение B является увеличением квадратной области на изображении A, а изображения C и D – увеличенными изображениями областей, указанных на



изображении B белой и чёрной стрелками соответственно. Изменение цвета от тёмного к светлому иллюстрирует изменение высоты от 80 до 15 мкм (по Kailas L., 2011; публикуется с разрешения the National Academy of Science, USA)

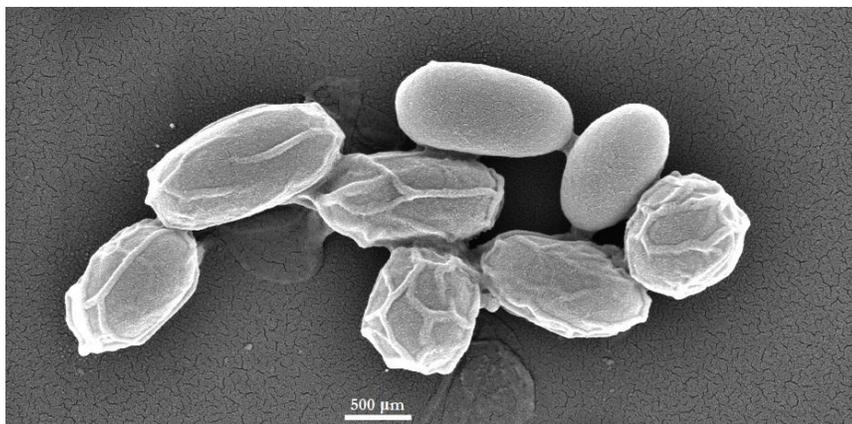


Рис. 2.6. Споры *B. anthracis* с бороздками на поверхности экзоспория. Две верхние правые споры лишены экзоспория, поэтому их поверхность выглядит гладкой (изображения М. Özel и G. Holland; любезно предоставлено Robert-Koch-Institut)

«колпачков», обнаруживается белок CotO, следует предположить, что он может способствовать «отрыву» (Рис. 2.7). При этом недавно была выдвинута теория¹, согласно которой пространство заполнено *внутренним полисахаридом*, поскольку белки, формирующие «колпачок», локализуются на септе незадолго до поглощения преспоры материнской клеткой, ввиду чего после поглощения в пространство между ними и ядром преспоры попадает полисахарид септы, на поверхности которого дальше собирается экзоспорий, а под поверхностью – оболочка.

Таким образом, сформированный экзоспорий обеспечивает механическую защиту споры и её адгезию (т. е. прикрепление). Однако это не единственные его функции. Так, например, поверхностный белок Alr преобразует необходимый для прорастания L-аланин в D-аланин, тем самым ингибируя преждевременное прорастание, а аргиназа, конкурирующая с синтазой оксида азота за L-аргинин, снижает концентрацию последнего в макрофагах² и, как

¹ Lehmann D., Sladek M., et al. *Role of novel polysaccharide layers in assembly of the exosporium, the outermost protein layer of the Bacillus anthracis spore.* Mol Microbiol. 2022; 118(3):258–277; DOI: 10.1111/mmi.14966.

² Аргиназа метаболизирует L-аргинин в L-орнитин и мочевины, тем самым снижая уровень аргинина, необходимого для синтеза оксида азота.

следствие, содержание губительного для бактерий азота, тем самым обеспечивая выживание споры. Белок ExsA отвечает за гидрофобность споры и защищает от действия лизоцима (напомним, что белки оболочки также проявляют эту способность)⁽¹⁾. Далее происходит лизис материнской клетки и выход сформированной споры во внешнюю среду, то есть материнская клетка *de facto* жертвует собой, чтобы обеспечить преспору необходимой «броней».

Наверняка самые внимательные уже задаются вопросом: почему, говоря о функции белков, так часто упоминались последствия их отсутствия? Дело в том, что для того, чтобы понять, какой вклад в формирование споры вносит тот или иной белок, следует посмотреть, как формирует спору штамм, у которого выключен ген, ответственный за синтез конкретного белка. И хотя этот метод даёт нам лишь косвенное представление, поскольку белки формируют спору во взаимодействии друг с другом, с его помощью мы можем хотя бы немного приоткрыть завесу этой тайны.

На поверхности экзоспория у некоторых близких родственников сибиреязвенного микроба, в частности *B. cereus* и *B. thuringiensis*, могут присутствовать выросты (Enas; от англ. endospore appendages), внешне напоминающие пили грамотрицательных бактерий и состоящие из белков экзоспория. Выросты имеют различную форму (Рис. 2.8) и обладают хорошими адгезивными свойствами за счёт термоустойчивости, нечувствительности к высыханию и химическим повреждениям. Помимо этого, у *B. thuringiensis* на поверхности спор формируются кристаллические *параспоральные тела*, в которых заключены инсектицидные Vt-токсины. Обычно они формируются одновременно со спорой внутри материнской клетки, но бывает ситуация, именуемая *ассоциацией споры и кристалла* (SCA, от англ. spore crystal association), когда тело формируется внутри экзоспория (Рис. 2.9). Обычно это происходит у штаммов подвида *finitimus*, имеющих две большие плазмиды, тогда как у штаммов, формирующих параспоральное тело по «классическому» сценарию, плазида только одна.

¹ Более подробно о белках экзоспория можно почитать: Stewart G. G. *The exosporium layer of bacterial spores: a connection to the environment and the infected host*. Microbiol Mol Biol Rev. 2015; 79(4):437–457; DOI: 10.1128/MMBR.00050–15.

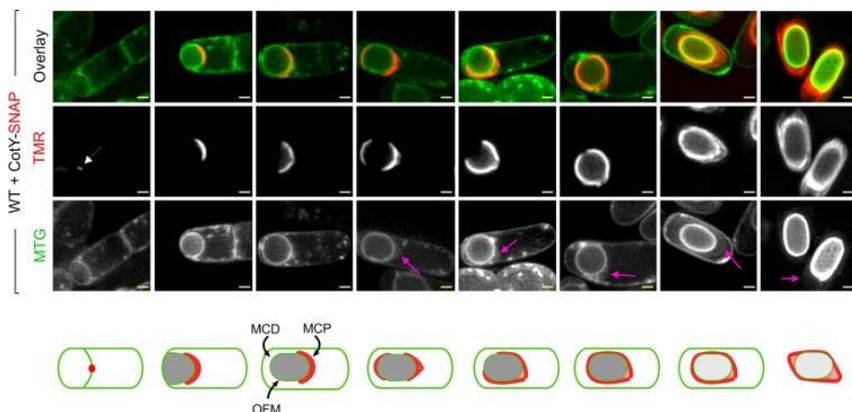


Рис. 2.7. Процесс сборки экзоспория (микрофотографии и схема), где белой стрелкой показан слабый сигнал от белка CotY, а розовой – «колпачки» (красные на схеме); MCP – проксимальный полюс преспоры, MCD – дистальный полюс преспоры, OFM – оболочка преспоры; масштаб 0,5 μm . В верхнем ряду зелёным подсвечены клеточные стенки, а оранжево-красным – белки, формирующие экзоспорий (по Lablaine A., 2021). Посмотрите на эти изображения и снова прочитайте о процессе формирования экзоспория, чтобы лучше понять этот сложный механизм и восхищаться им

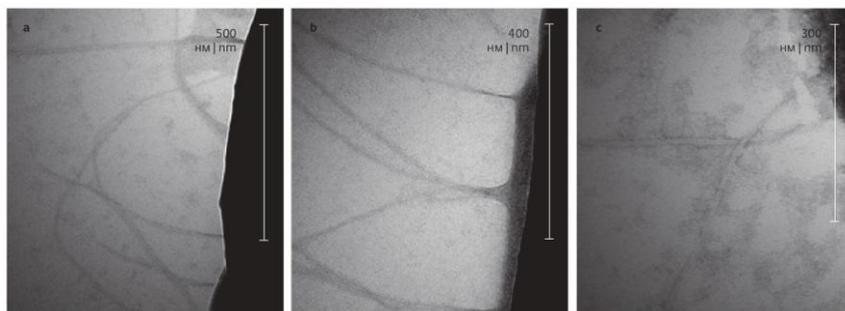


Рис. 2.8. Споровые выросты:
a – одиночные длинные гибкие у штамма *B. cereus* 239;
b – пучкообразные ветвящиеся у штамма *B. cereus* 172;
c – трубчатые у штамма *B. cereus* 19 (по Плиева З. С., 2020)

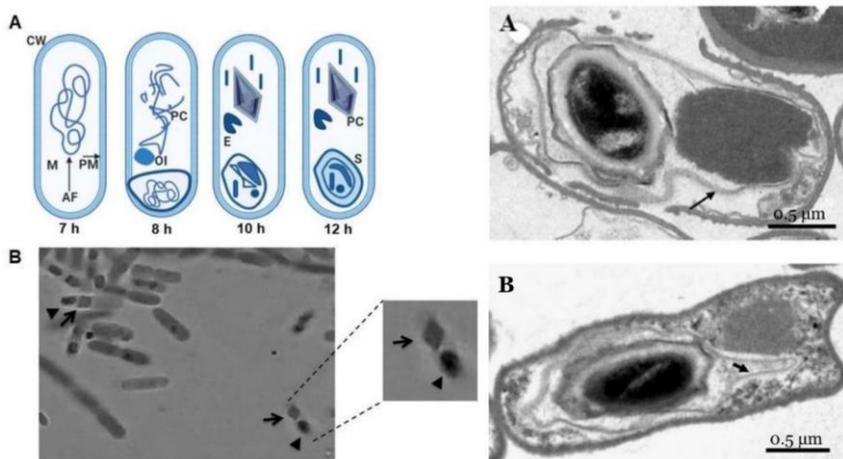


Рис. 2.9. Схема формирования параспоральных тел и спор (А, слева) и микрофотография (В, слева; *ув.* 100х) с телом в виде бипирамидального кристалла (стрелка) и спорой (наконечник стрелки). На электронной микрофотографии ультратонкого среза (справа) можно видеть параспоральное тело, формируемое внутри экзоспория (А) и вне него (В). Стрелка указывает на экзоспорий. CW – клеточная стенка, М – мезосома, РМ – плазматическая мембрана, АF – аксиальная нить, РС – параспоральное тело (бипирамидальный кристалл), ОI – оvoidное включение, E – экзоспорий, S – спора (слева по Gonzalez-Vazquez M. С., 2021; справа по Zhu Y., 2011)

Вышедшая из материнской клетки спора может сохраняться во внешней среде несколько десятилетий и даже столетий. Метаболически она неактивна, а взаимодействие со средой обеспечивают белки оболочки и экзоспория.

С наступлением благоприятных времён спора может «принять решение» о прорастании. Кох пишет: *Все попытки развить споры в дистиллированной или колодезной воде при обычной температуре и при 35 °С не увенчались успехом... В конце концов я применил следующий подход, который привёл к цели. На покровное стекло помещали каплю споровых масс, подсушивали и помещали на предметное стекло, на которое заранее наносили чистую водянистую влагу (humor aquosus) бычьей камеры глаза, чтобы она заполнила всё пространство покровного стекла, и споровые массы смачивались этой жидкостью. Не запечатанный маслом препарат помещался во влажную камеру, которую инкубировали при 35 °С... Уже через 3–4 часа стал заметен рост спор (Рис. 2.1-Fig.5). Наиболее развитым он был у края покровного стекла.*

Как несложно догадаться, стимуляторами прорастания служат различные химические соединения, в основном питательные вещества, молекулы которых способны пройти сквозь поры экзоспория¹, оболочки и связаться с герминальными рецепторами внутреннего слоя коры, а также снижение кислорода воздуха. Далее наступает период так называемой *задержки*, о котором мы ничего не знаем, кроме того, что он может длиться от нескольких минут до суток (долгопрорастающие споры принято называть сверхспящими). Вполне вероятно, что длительность этого периода зависит от количества герминальных рецепторов. Затем из ядра высвобождаются катионы (преимущественно H^+ , K^+ и Na^+) и наступает этап I, на котором белок SpoVA образует во внутреннем слое коры каналы, через которые из ядра высвобождается значительное количество Ca^{2+} -дипиколиновой кислоты (дипиколиновая кислота в хелате в концентрации 1:1 с Ca^{2+} ; CaDPA), совместно с белком внутреннего слоя GerD активирующей белок оболочки CwlJ, который, как говорилось ранее, разрушает кору споры. С этого момента наступает этап II на котором спора впитывает значительное количество воды (регидратация), благодаря чему внутренний слой набухает, становясь полноценной клеточной стенкой, а в ядре запускаются метаболические процессы. Выход прорастающей споры из экзоспория осуществляется через проксимальный «колпачок», что, вероятно, связано с отсутствием в нём белка Alr (напомним: этот белок ингибирует прорастание).

Вышедшая во внешнюю среду вегетативная клетка имеет клеточную оболочку, состоящую из цитоплазматической мембраны⁽²⁾, покрытой толстым слоем пептидогликана, поверх которого залегают вторичные полисахариды клеточной стенки (например, липо-

¹ Следует отметить, что высокое давление (более нескольких тысяч атмосфер) также запускает процесс прорастания, однако такое не встречается в природе.

² Интересно, что мембрана *B. anthracis* отличается от мембран близкородственных *B. cereus* и *B. thuringiensis* тем, что в ней содержится меньше разветвлённых жирных кислот i13:0, a13:0 и i14:0 (см. Kaneda T. *Fatty acids in the genus Bacillus I. Iso- and anteiso-fatty acids as characteristic constituents of lipids in 10 species.* J Bacteriol. 1967; 93(3):894–903; DOI: 10.1128/jb.93.3.894–903.1967). Предлагалось использовать это различие во время вспышек для видовой дифференцировки, однако технические сложности и развитие молекулярно-генетических методов не позволили реализовать эту идею на практике.

тейхоевые кислоты⁽¹⁾), а за ними – белковый паракристаллический массив, именуемый S-слоем⁽²⁾ (Рис. 2.10). Всё это покрыто капсулой из поли- γ -D-глутамата (PDGA), которая отсутствует в том случае, если клетка лишена плазмиды pXO2 (о плаزمидах сибиреязвенного микроба поговорим далее) или гены на ней не активны.

Клеточная оболочка играет важную роль в жизни бактерии, являясь той границей, которая делает её жизнь возможной. Так, сортазы (т. е. ферменты, модифицирующие белки) мембраны клеточной стенки осуществляют прикрепление белков, обеспечивающих размножение внутри макрофагов (сортаза StrA), поглощение железа (сортаза StrB) и прикрепление некоторых белков, участвующих в споруляции (сортаза StrC). S-слой, по-видимому, играет важную роль в целостности бактерии⁽³⁾, а располагающийся в нём белок BslO (BSL) катализирует деление клеток. Другой белок, ВА3338, структурно похож на интерналин, способствующий проникнове-

¹ Ранее считалось, что эти кислоты, свойственные грамположительным бактериям, отсутствуют у *B. anthracis*, однако недавние исследования показали обратное. Интересно, что отсутствие генов *ltaS1* или *ltaS2* приводит к неспособности синтезировать липотейхоевые кислоты и, как следствие, к изменению морфологии клеточной оболочки, и снижению эффективности споруляции, и абберативному (т. е. ненормальному) делению (см. Garufi G., Hendrickx A., et al. *Synthesis of lipoteichoic acids in Bacillus anthracis*. J Bacteriol. 2012; 194(16):4312–4321; DOI: 10.1128/JB.00626–12).

² Интересно, что этот слой de facto состоит из двух взаимозаменяемых слоёв, существование которых связано с фазой роста бактерии: основным компонентом S-слоя экспоненциальной фазы является поверхностный белок массива (Sap), который постепенно вытесняется экстрагируемым антигеном 1 (EA1), являющимся основным компонентом S-слоя стационарной фазы. EA1 неоднороден и имеет большое число разрывов, тогда как Sap более гибок и, таким образом, адаптирован для покрытия быстро делящихся клеток в экспоненциальной фазе. Вместе с тем гены *sap* и *eag*, соответственно кодирующие Sap и EA1, могут отсутствовать у ближайших родственников сибиреязвенного микроба. Так, например, они отсутствуют у *B. pseudomycoides*, а их присутствие обнаружено лишь у двух штаммов *B. thuringiensis* (см. Mignot T., Mesnage S. et al. *Developmental switch of S-layer protein synthesis in Bacillus anthracis*. Mol Microbiol. 2002; 43(6):1615–1627; DOI: 10.1046/j.1365–2958.2002.02852.x; Soufiane B., Sirois M., et al. *Mutually exclusive distribution of the sap and eag S-layer genes and the hylB/hylA cell wall hydrolase genes in Bacillus thuringiensis*. Antonie Van Leeuwenhoek. 2011; 100(3):349–364.; DOI: 10.1007/s10482–011–9590–1).

³ Недавний опыт по деполимеризации S-слоя продемонстрировал быстрое разрушение клеток в отличие от клеток, не способных синтезировать белок Sap S-слоя, поскольку, по-видимому, белок EA1 таких клеток способен устранять дефекты (см. Chateau A., der Verren S. E., et al. *The Bacillus anthracis cell envelope: composition, physiological role, and clinical relevance*. Microorganisms. 2020; 8(12):1864; DOI: 10.3390/microorganisms8121864). Интересно, что Sap также является мишенью для бактериофагов, а EA1 присутствует в оболочке спор, хотя его функции неизвестны.

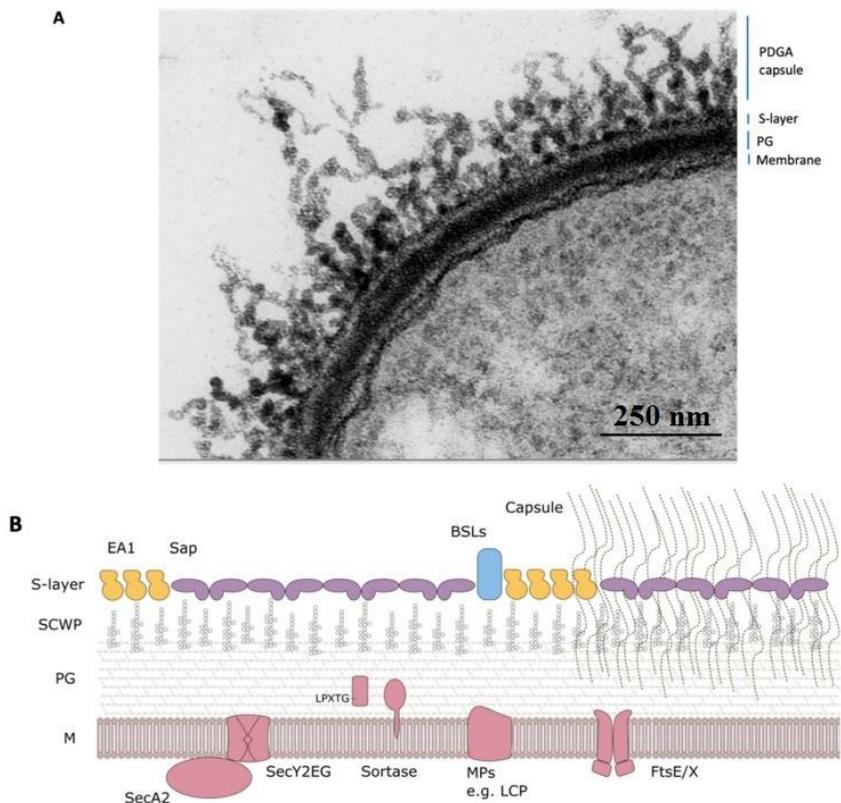


Рис. 2.10. Организация клеточной оболочки *B. anthracis*; электронная микрофотография тонкого среза с негативным окрашиванием (A) и схематическое изображение организации (B), где для удобства понимания капсула показана только в правой части: M – мембрана, PG – пептидогликан, SCWP – вторичные полисахариды клеточной стенки (по Chateau A., 2020)

нию бактерии в клетки млекопитающего, а уже знакомый нам белок BslA (напомним: он входит в состав ворсинок экзоспония), синтез которого кодируется плазмидой рХО1, обеспечивает прикрепление к ним. Наконец капсула, синтез которой происходит в ответ на сигналы окружающей среды, такие как колебания концентрации CO₂ и бикарбоната, подобно плащу-невидимке скрывает поверхностные антигены бактерии от иммунной системы.

Считается, что возбудитель сибирской язвы, бактерия *B. anthracis*, возник относительно недавно, примерно 10 000 лет назад. Это крупная грамположительная неподвижная палочка, существующая в трёх формах – капсульной и бескапсульной вегетативной, а также споровой. Вегетативные формы имеют размер 1–1,5 x 6–10 мкм, концы слегка закруглены или как бы обрублены и слегка вогнуты. Споры имеют размер 0,8–1,0 x 1,2–1,5 мкм. Геном состоит из кольцевой хромосомы и двух внехромосомных элементов – плазмид вирулентности, приобретение которых стало главным эволюционным событием, выделившим сибиреязвенный микроб в качестве самостоятельного вида.

Плазмида pXO1 была открыта в 1983 году^{<1>} двумя исследовательскими группами, искавшими генетическую детерминанту, ответственную за продукцию бактерией токсинов, открытых ещё в начале 1950-х годов^{<2>}. Выделенная ими плазмида размером 181–182 Кб получила название pBA1 (Рис. 3.1), однако позже с целью унификации названия со второй плазмидой была переименована в pXO1. На этой плазмиде расположено 134 открытых рамки считывания (ORF, от англ. Open Reading Frame), то есть 134 области, потенциально способных кодировать синтез 134 белков. Функции большинства из них неизвестны, но некоторые ORF кодируют белки, схожие с белками других микроорганизмов, поэтому мы можем предполагать^{<3>} их функции. Так, ORF 07 кодирует белок, на 56 % сходный с обратной транскриптазой *Escherichia coli*; ORF 13 – на 43 % сходный с белком инвазии *Plasmodium yoelii*; ORF 18 – на 46 %

¹ Mikesell P., Ivins B. E., et al. *Evidence for plasmid-mediated toxin production in Bacillus anthracis*. Infect Immun. 1983; 39(1):371–376; DOI: 10.1128/iai.39.1.371–376.1983; Robillard N. J., Koehler T. M., et al. *Plasmid pBA1-mediated toxin production in Bacillus anthracis cells*. Abstr. Annu Meet Amer Soc Microbiol. 1983; H54:115.

² Smith H., Keppie J. *Observations on experimental Anthrax: demonstration of a specific lethal factor produced in vivo by Bacillus anthracis*. Nature. 1954; 173:869–870; DOI: 10.1038/173869a0; Smith H., Keppie J. et al. *The chemical basis of the virulence of Bacillus anthracis. V. The specific toxin produced by B. anthracis in vivo*. Br J Exp Pathol. 1955; 36:460–472.

³ Okinaka R. T., Cloud K., et al. *Sequence and organization of pXO1, the large Bacillus anthracis plasmid harboring the anthrax toxin genes*. J Bacteriol. 1999; 181(20):6509–6515; DOI: 10.1128/jb.181.20.6509–6515.1999

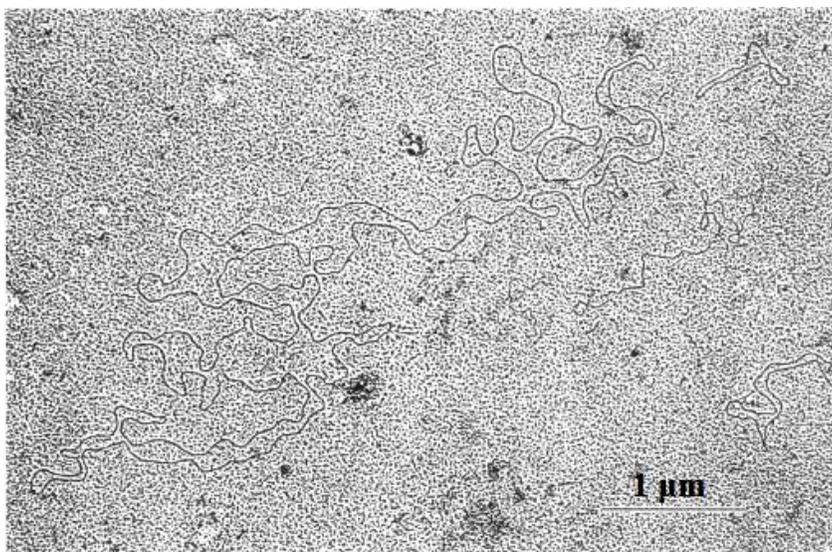


Рис. 3.1. Микрофотография плазмиды pVA1 (сейчас pXO1) массой 114 МДа, выделенной из штамма *B. anthracis* Vollum 1B. В правом верхнем углу приведена стандартная ДНК φX174 массой 3,558 МДа (по Mikesell P., 1983; публикуется по лицензии the American Society for Microbiology; разрешение передано через the Copyright Clearance Center, Inc.)

сходный с белком интегразы *Methanothermobacter thermautotrophicus*; ORF 59 – на 53 % сходный с секреторной протеинкиназой *Chlorobium limicola*; а ORF 115 – на 67 % сходный с резолвазой *Enterococcus faecium*. Примечательно, что большинство микроорганизмов являются грамотрицательными бактериями, однако наибольшее сходство обнаружено, конечно же, с белками близких родственников: кодируемые ORF 35, 36 и 39 белки сходны с транспозазами *B. thuringiensis* на 95, 74 и 94 % соответственно.

Наибольший интерес представляет зона, ограниченная с двух сторон почти идентичными IS1627-элементами, которую принято называть **остров патогенности**. Предполагается, что он содержит в общей сложности тридцать одну ORF. На нём располагаются гены сибиреязвенного токсина:

- ген *pagA* (ORF 110), кодирующий **протективный антиген** (PA, от англ. protective antigen), представляющий собой по-рообразующий белок;

- ген *lef* (ORF 107), кодирующий **летальный фактор** (LF, от англ. lethal factor), представляющий собой цинк-зависимую металлопротеазу, специфичную в отношении митоген-активируемых киназ клетки млекопитающего, расщепляя которые, она нарушает сигнальные пути этих клеток;
- ген *суа* (ORF 122), кодирующий **отёчный фактор** (EF, от англ. edema factor), представляющий кальмодулин-зависимую аденилатциклазу, которая за счёт увеличения уровня синтеза циклического аденозинмонофосфата также нарушает сигнальные пути клетки млекопитающего¹;

а также их регуляторные гены *atxA* (ORF 119) и *pagR* (ORF 109).

На этом моменте лучше положить закладку или даже выписать названия генов и синтез каких белков они кодируют, поскольку с первого раза эта информация не запомнится, но понадобится в дальнейшем.

Идём далее. Протективный антиген связывается со специфическими клеточными рецепторами – белками, синтезированными на поверхности клетки восприимчивого млекопитающего. В качестве таких белков выступают рецепторы сибиреязвенного токсина AN-TRX1 и ANTRX2, также, соответственно, известные как маркер эндотелия опухоли – 8 (TEM-8) и белок морфогенеза капилляров – 2 (CMG-2), а также белок 6, связанный с рецептором липопротеинов низкой плотности (LRP6), и интегрин $\beta 1$, хотя связывание с ними происходит в меньшей степени. Далее, под действием клеточно-ассоциированной протеолитической активности фурина, протективный антиген (PA83) расщепляется на PA20 и PA63. При этом отщепление PA20 способствует самоорганизации PA63 в кольцеобразный гептамер (препору)⁽²⁾ и открывает на нём гидрофобную поверхность, что обеспечивает связывание с летальным и отёчным факторами, то есть образование **летального токсина** (LT, от англ. lethal toxin) и **отёчного токсина** (ET, от англ. edema toxin), состоя-

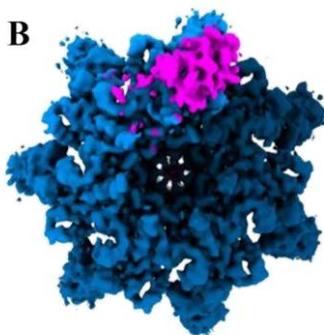
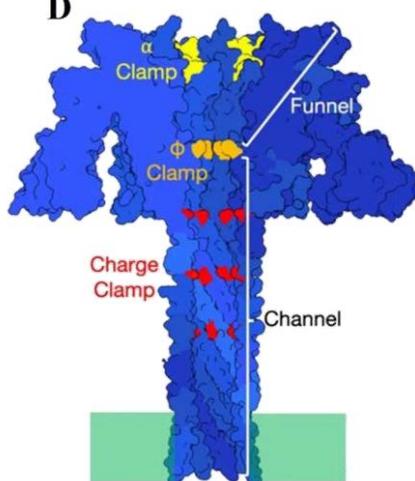
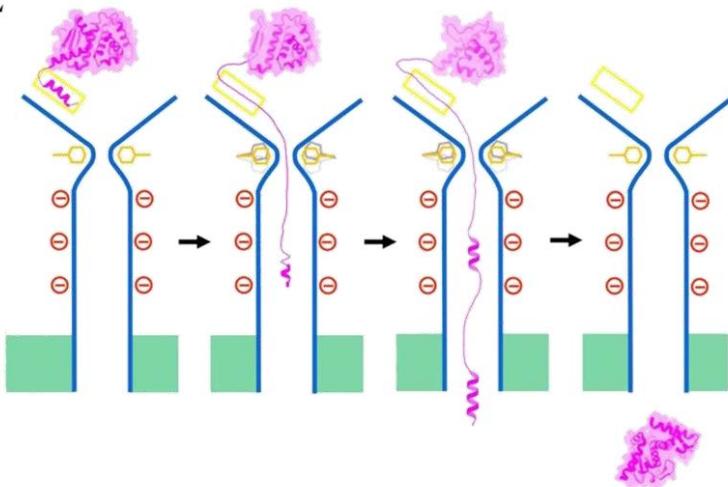
¹ Клиническое действие фактора проявляется в виде отёка тканей, что и стало основанием для его названия.

² Также формируется октамерная структура, которая более рН-стабильна, чем гептамерная, и может сохраняться в плазме, однако её роль всё ещё не ясна (см. Kintzer A. F., Thoren K. L., et al. *The protective antigen component of anthrax toxin forms functional octameric complexes*. J Mol Biol. 2009; 392(3):614–629; DOI: 10.1016/j.jmb.2009.07.037).

щих из субъединицы А (LF или EF) и субъединицы В (РА). Они, в свою очередь, перемещаются в эндосомы, где высокая концентрация протонов (низкие значения рН) способствует формированию поры, которая вставляется в эндосомальную мембрану, образуя канал. Через этот канал летальный и отёчный факторы транслоцируются в цитозоль клетки. Интересно, что просвет поры (диаметр канала в поперечном разрезе) очень мал и значительно *уже* диаметра транслоцируемых белковых структур. Так как же они туда протискиваются? Дело в том, что низкий рН влияет не только на РА63, но и на прикрепленные к нему летальный и отёчный факторы, которые под его действием становятся неупорядоченными *расплавленными глобулами*. Это такое состояние белка, при котором он как бы слегка денатурируется (развёртывается) и переходит в структуру между третичной и вторичной, то есть лишается плотной упаковки боковых цепей. В таком виде он компактный (глобула) и за счёт градиента рН между эндосомой и цитозолем быстро втягивается («вплывает») в цитозоль цитоплазмы.

Происходит это следующим образом (Рис. 3.2). Белок (фактор) связывается с ободком воронки поры и, разворачиваясь, направляется вниз по сужающейся структуре к каналу поры, именуемому β -ствол. Тут он встречает α -зажим, который связывает спиральные части белка, располагая их по направлению к просвету β -ствола. Далее он проходит Ф-зажим, представляющий собой кольцевую структуру в 6 \AA (0,6 нм), поддерживающую градиент рН. Чтобы пройти через столь узкое кольцо, белок полностью разворачивается и потом снова сворачивается. Продвигаясь по β -стволу, он взаимодействует с зажимами заряда, которые обеспечивают направление его движения. Попав в цитозоль, токсин распадается на две субъединицы (летальный и отёчный факторы), которые нарушают сигнальные пути клетки, что приводит к её гибели.

Невольно напрашивается вопрос: зачем нужен настолько сложный механизм? Скорее всего именно он обеспечивает наиболее быстрое прохождение белка в клетку, поскольку очевидно, что для этого ему необходимо развернуться, а последовательное прохождение зажимов позволяет в каждый момент времени иметь раскрытым лишь небольшой участок. Этот процесс можно сравнить с перематыванием плёнки с одной бобины на другую: задача значи-

A**B****C****D****E**

тельно усложнится, если Вы сначала разматываете плёнку с одной бобины, а затем будете накручивать на другую. В процессе намотки она попросту перепутается. Однако если Вы будете одновременно крутить бобины, плёнка легко и быстро перемотается с одной на другую.

Плаزمид рХО2 была открыта двумя независимыми группами в 1985 году¹ и получила название рХО2. Её размеры варьируются от 94 до 96 Кб. Плазмид имеет 85 ORF, но наибольший интерес представляет оперон *capBCAD*, обеспечивающий капсулообразование, а также регуляторные гены *aspA* и *aspB*, которые косвенно регулируются геном *atxA*, расположенным на плазмиде рХО1 в ответ на увеличение содержания CO₂ и бикарбоната⁽²⁾. Синтезируемая действием генов *capB*, *capC* и *capA* оперона капсула состоит из анионного полимера γ -связанных остатков D-глутаминовой кислоты, то есть поли- γ -D-глутамата (PDGA). Она ковалентно связана с пептидогликаном клеточной стенки (проходя через S-слой; **Рис. 2.8-В**), что обеспечивается ферментом CapD, кодируемым геном *capD* оперона³.

◀ **Рис. 3.2.** Карта плотности видов сбоку (А) и сверху (В), молекулярная модель вида сбоку (С) и боковой разрез (D) поры, сформированной протективным антигеном, а также схема (Е) транслокации белка (розовый) через пору и его взаимодействие с α -зажимом (жёлтый) в воронке (Funnel) поры, и Φ -зажимом (рыжий), и зажимом заряда (красный) в β -стволе (Channel) поры (по Macher A. J., 2021)

¹ Green B. D., Battisti L., et al. *Demonstration of a capsule plasmid in Bacillus anthracis*. Infect Immun. 1985; 49(2):291–297; DOI: 10.1128/iai.49.2.291–297.1985; Uchid I., Sekizaki T., et al. *Association of the encapsulation of Bacillus anthracis with a 60 megadalton plasmid*. J Gen Microbiol. 1985; 131:363–367.

² Опосредованно он также активирует хромосомный ген *eag*, кодирующий синтез экстрагируемого антигена 1 (ЕА 1) S-слоя. В предыдущей главе мы говорили, что S-слой состоит из двух взаимозаменяемых белков, существование которых связано с фазой роста бактерии. Таким образом, в ответ на повышение концентрации CO₂ синтезируется ЕА1, что характерно для стационарной фазы роста, тогда как при снижении концентрации CO₂ активируется хромосомный ген *sap*, кодирующий синтез поверхностного белка массива (Sap), что характерно для прорастания клетки и деления её вегетативной формы. Также в формировании S-слоя принимают участие белки, кодируемые генами *bslA*, *bslB* и *amiA*. Первый ген, расположенный на плазмиде рХО1, кодирует белок адгезии, а второй и третий гены, расположенные на плаزمиде рХО1и рХО2 соответственно, синтезируют белки, чья функция пока не установлена.

³ Ранее белок именовался Der, а ген, его кодирующий, – *der*. Эти названия всё ещё можно встретить в научной литературе.

Этот фермент, расположенный на поверхности пептидогликана, за счёт расщепления пептидной связи серин-треонин в позициях 351 и 32 (пишут: Ser³⁵¹–Thr³⁵²) и, соответственно, высвобождения N-концевой аминокислотной группы Thr³⁵² обеспечивает захват поли-γ-глутаматных цепей капсулы (*реакция транспептидации*), словно якорем притягивая её к поверхности клеточной стенки. Следовательно, невозможность синтеза фермента значительно снижает вирулентность штамма, что было показано¹ в опыте на мышах.

Помимо защитной функции, капсула сигнализирует преспоре о возможности сбора летального и отёчного токсинов через формирование лиганда, блокирующего переход преспоры в спору под действием снижения pH. К моменту, когда токсины соберутся, pH будет уже настолько низким, что лиганд разрушится.

Хромосома сибиреязвенного микроба имеет размеры около 5,2–5,3 Мб. Из множества расположенных на ней генов лишь немногие позволяют отличить *B. anthracis* от ближайших родственников, таких как, например, *B. cereus* и *B. thuringiensis*. «Общими», в частности, являются гены, обеспечивающие спорообразование, а некоторые гены, ранее считавшиеся специфичными для сибиреязвенного микроба (гены *BA813*, *gyrA*, *gyrB* и *rpoB*), позднее были обнаружены у некоторых штаммов *B. cereus*, что в значительной степени затрудняет молекулярно-генетическую диагностику, приводя к ложноположительным результатам. С другой стороны, наличие мутации в «общих» генах хотя и может быть использовано для дифференцировки, всё же затруднено в рутинной практике² ввиду единичности этих мутаций. Например, ген *plcR*, который в случае *B. anthracis* содержит однонуклеотидную мутацию (вставка тимина в позиции 640), инактивирующую его, поэтому вплоть до настоящего дня продолжается поиск хромосомных маркеров, специфичных исключительно для сибиреязвенного микроба.

¹ Candela T., Fouet A. *Bacillus anthracis* CapD, belonging to the gamma-glutamyltranspeptidase family, is required for the covalent anchoring of capsule to peptidoglycan. Mol Microbiol. 2005; 57(3):717–726; DOI: 10.1111/j.1365–2958.2005.04718.x.

² Конечно, никто не отменяет «золотой стандарт» – выделение чистой культуры на чашке Петри и её последующее исследование (подвижность, гемолитическая активность и т. д.), однако эти методики занимают продолжительное время в отличие от молекулярно-генетических методов (читайте о них в Главе 25).

Среди уникальных хромосомных генов *B. anthracis* достаточный интерес представляет область VA1693-VA1699, гипотетически кодирующая белки, принадлежащие к семейству гликозилтрансфераз, то есть ферментов, катализирующих перенос остатков моносахаридов от углерода-акцептора на молекулу-донора. В частности, исследование¹ белка, кодируемого геном VA1698, показало его взаимодействие с ферментами синтеза гликогена и с УДФ-глюкозо-6-дегидрогеназы, то есть ген играет роль, соответственно, в накоплении энергии, в синтезе основных полисахаридов, формирующих клеточную стенку, а также в синтезе капсулы.

Также на хромосоме располагаются четыре уникальные области, сформированные *профагами*². Так, в области, являющейся γ -подобным профагом λ Va02, располагается ген, кодирующий эндолизин PlyL, который имеет высокую степень сходства с эндолизином PlyG гамма-бактериофага, лизирующего клеточную стенку сибиреязвенного микроба и некоторых представителей рода *Bacillus*. В области, являющейся γ -подобным профагом λ Va03, располагается ген, кодирующий белок VA4079, который похож на рецептор-связывающие белки γ -бактериофагов, обеспечивающий связывание с клеточной стенкой *B. anthracis*. Примечательной особенностью этого белка является термостабильность, поскольку он не теряет своих функций даже при инкубации при 98 °С, то есть температуре инактивации (гибели) вегетативных клеток. Дают ли эти белки какое-то дополнительное преимущество бактерии, пока неизвестно.

Говоря о внутривидовом разнообразии, следует констатировать, что геном сибиреязвенного микроба является суперконсервативным, то есть возбудитель является *мономорфным видом*, чему способствует его длительное сохранение в виде споры, иногда достига-

¹ Zorigt T., Furuta Y., et al. *Pan-genome analysis reveals novel chromosomal markers for multiplex PCR-based specific detection of Bacillus anthracis*. BMC Infect Dis. 2024; 24:942; DOI: 10.1186/s12879-024-09817-9.

² Бактериофаги (фаги) или вирусы бактерий подразделяются на вирулентные и умеренные. Первые в результате своего жизненного цикла производят новые копии внутри бактериальной клетки и чаще всего вызывают разрушение её стенки, то есть реализуют литический цикл, в связи с чем их также называют *литическими*. Вторые «живут» в бактерии в виде генетической информации, чаще всего встраиваясь в её геном (такое состояние принято называть *профагом*), то есть реализуют лизогенный цикл, однако при наступлении «тяжёлых времён» они могут перейти к реализации литического цикла.

ющее десятилетий и, вероятно, столетий, что, следовательно, снижает условное среднее количество циклов репликации генома в год и относительную скорость его эволюции. Эта мысль также подтверждается определением так называемого *пангеномного статуса*, показывающего возможность обнаружения новых уникальных генов возбудителя при секвенировании его новых штаммов. Статус определяется через закономерность, описываемую¹ эмпирическим законом Хипса (Heaps' law)²:

$$n = kN^\gamma,$$

где n – количество генов, N – количество геномов, k – количество уникальных генов при рассмотрении одного генома, γ – скорость, с которой добавляются новые гены по мере включения дополнительных геномов.

Интересно, что данный закон «перекочевал» из лингвистики, где с его помощью описывается распределение уникальных слов в одном документе относительно других, поскольку ведь и геном по сути – это набор «слов»-генов. Если γ стремится к единице (то есть количество уникальных «слов»-генов значительно увеличивается по мере секвенирования новых штаммов), следует говорить об открытом пангеноме, тогда как в противоположной ситуации – о закрытом. Исследования³ показывают, что *B. anthracis* имеет закрытый пангеном ($\gamma = 0,09$), чего не скажешь о его ближайших родственниках, например, *B. cereus* ($\gamma = 0,51$) и *B. thuringiensis* ($\gamma = 0,52$).

Понимание внутривидовой таксономии сибиреязвенного микроба крайне важно, поскольку возбудитель всё же эволюционирует (несмотря на присущую ему мономорфность) и к настоящему моменту, преимущественно торговыми путями, распространён почти по всему земному шару (за исключением Антарктиды и некоторых островов). При этом определение его «национальности» представляет собой не только сугубо научный интерес, но и основу санитарной охраны. На основе анализа 14 так называемых «канонических»

¹ Tettelin H., Riley D., et al. *Comparative genomics: the bacterial pan-genome*. Curr Opin Microbiol. 2008; 11(5):472–277; DOI: 10.1016/j.mib.2008.09.006.

² Назван в честь Гарольда Стэнли Хипса (Harold Stanley Heaps), но в действительности открыт Густавом Герданом (Gustav Herdan) в 1960 году, поэтому иногда именуется «законом Хипса – Гердана» (Herdan-Heaps' law).

³ Zorigt T., Furuta Y., et al. *Pan-genome analysis reveals novel chromosomal markers for multiplex PCR-based specific detection of Bacillus anthracis*. BMC Infect Dis. 2024; 24:942; DOI: 10.1186/s12879-024-09817-9.

однонуклеотидных полиморфизмов (canSNP; от англ. canonical single nucleotide polymorphism) все штаммы *B. anthracis* принято подразделять на **три эволюционные линии** (А, В и С), которые, в свою очередь, подразделяются на подлинии или группы (**Рис. 3.3 и Рис.3.4**).

Линия А наиболее генетически разнообразна. Африканская canSNP-группа A.Br.005/006 традиционно считается самой древней, от которой отделилась группа A.Br.Vollum, чьи штаммы обнаруживаются в Иране, Пакистане и Афганистане (реже в Туркменистане, Таджикистане, США и Европе). Далее отделилась группа A.Br.008/009, которая из-за весьма успешного распространения в Азии и Европе получила название ТЕА (от англ. Trans-Eurasian). Штаммы этой группы широко распространены в России, а также выделяются в Японии, Китае и США. От неё произошли: группа A.Br.008/011, штаммы которой выделяются в России, Словакии, Греции и Китае (подгруппа Tsiankovskii), Западной Сибири и Грузии (подгруппа STI); группа A.Br.011/009, штаммы которой выделяются в районе Абрुццо (Италия), Франции и от героиновых наркоманов¹; а также группа A.Br.WNA, штаммы которой были завезены в Северную Америку, и кластер групп Va.A0362, Va.A0417, Va.A0324 и Sverd.7RA93.15.15, причём последняя группа данного кластера образована штаммом, приведшим к гибели людей в 1979 году во время аварии на военном объекте Свердловск-19 (СССР)². Также выделяют группы A.Br.003/004, A.Br.001/002, A.Br.005/006 и A.Br.Aust94. Штаммы первой группы распространены в Южной Америке (меньше в Европе и США), а также ЮАР (подгруппа A.Br.172), Зимбабве и Мозамбике (подгруппа A.Br.102). Штаммы

¹ Ранее относились к подгруппе Heroin группы A.Br.008/011, что ещё можно встретить в научной литературе. Распространение этих штаммов связано с путями нелегальной транспортировки героина, поэтому они встречаются в Европе, странах СНГ, Турции, Афганистане, Индии, Бангладеше, Иране. Особенности клинического течения при инфицировании этими штаммами рассмотрим в Главе 13.

² Эта трагедия как пример пренебрежения правилами биобезопасности уже упоминалась в Главе 27 Оперы о чуме, но мы её дополнительно ещё рассмотрим в Главах 12 и 14. Штамм Anthrax836, о котором идёт речь, был выделен от грызуна в 1956 году в городе Кирове (СССР). Имеются сведения, что он возник в результате утечки в канализацию менее вирулентного штамма по причине неисправности ферментёра, из-за чего, несмотря на проводимую дезинфекцию, имели случаи заражения сибирской язвой грызунов.

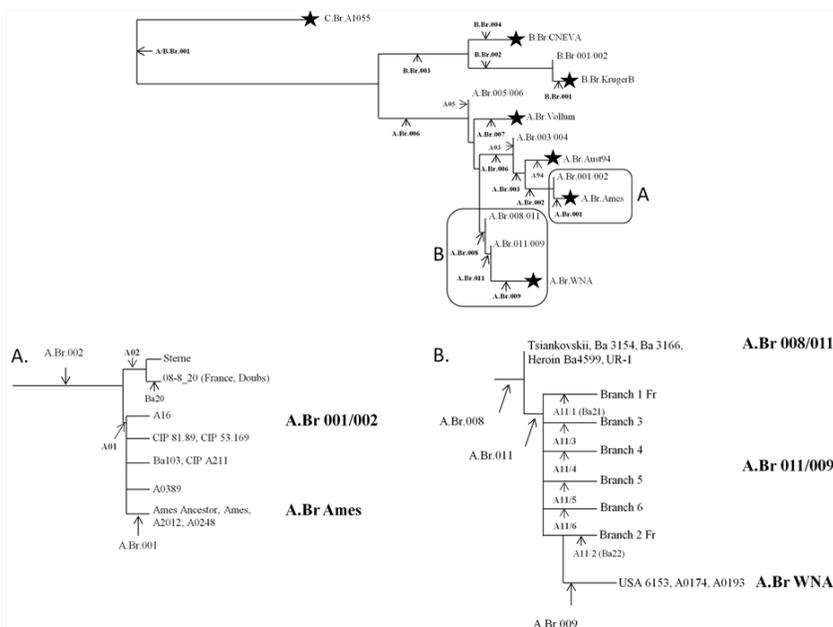


Рис. 3.3. Филогения основных *capSNP*-групп *B. anthracis* (семь завершённых полногеномных последовательностей определяют конечные точки, что отмечено звёздочкой). Вставками А и В показано деление групп *A.Br.001/002* и *A.Br.011/009* (по Girault G., 2014)

второй группы подразделяются на подгруппы *A.Br.01*, *A.Br.02* и *A.Br.82*. Подгруппа *A.Br.02* в свою очередь подразделяется на *A.Br.81* (или *A.Br.Ames*) и *A.Br.75* (или *A.Br.Sterne*), распространённые в Африке, центральном и восточном Китае, а *A.Br.Ames* – также в Сибири и Японии. Кроме того, считается, что именно от группы *A.Br.001/002* произошли штаммы, выделяемые в Чаде, Мали, Камеруне и Нигерии, названные WAG (от англ. West Africa Group), отличающиеся отсутствием антрозы (т. е. сахара, входящего в состав *VclA*)¹. Штаммы третьей группы – в Австралии, ЮАР, Намибии, Ботсване и Европе. Штаммы четвёртой группы – в Турции, Индии и западном Китае, редко в ЮАР.

¹ Последние исследования показывают, что антроза-отрицательные штаммы также встречаются среди штаммов иных групп, например, групп *A.Br.003/004*, *A.Br.81* (*A.Br. Ames*), *A.Br.011/009* (героиновые), и даже *B.Br.CNEVA*.

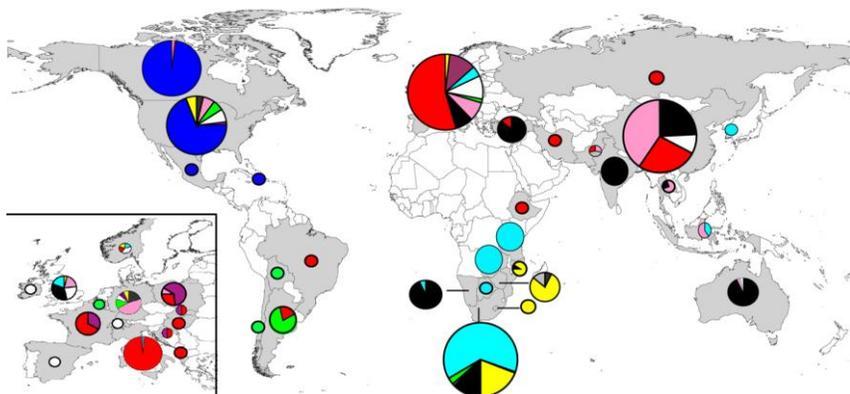


Рис. 3.4. Глобальное распространение основных *canSNP*-групп *B. anthracis* по данным на 2007 год (по Van Ert M. N., 2007). Следует понимать, что каждое новое исследование дополняет и изменяет эту «картину мира»
 Линия А: A.Br.Vollum (бирюзовый), A.Br.008/009 (красный), A.Br.WNA (синий), A.Br.005/006 (белый), A.Br.003/004 (зелёный), A.Br.Australia-94 (чёрный), A.Br.001/002 (розовый)
 Линия В: V.Br.CNEVA (фиолетовый), V.Br.001/002 (жёлтый)
 Размеры кругов показывают количественное соотношение исследованных штаммов

Линия В менее разнообразна. Группа V.Br.CNEVA распространена исключительно в континентальной Европе, преимущественно в регионе Альп. Группа V.Br.001/002 распространена в Южной Африке, Европе и Корее. К ней также относятся штаммы, выделенные из вечной мерзлоты (Ямал и Якутия), а также с территории Восточной Сибири и Дальнего Востока (подгруппа Siberia), Южной Кореи (подгруппа Asia). Штаммы производной от неё ветви V.Br.Kruger до 1981 года были широко распространены¹ в северной части Национального парка Крюгер (Kruger National Park), ЮАР, в честь которого и получили своё название. В 2011 году в той же провинции на территории частного заповедника был изолирован штамм от больного гепарда (*Acinonyx jubatus*)², составляющий новую южноафри-

¹ В период с 1982 по 1997 год выделен только один штамм, после штаммы не выделялись.

² Выделение настоящего штамма стало возможным исключительно благодаря особому охранному статусу гепардов в провинции Лимпопо. И хотя гепарды весьма восприимчивы к токсинам, они хорошо реагируют на вакцинацию, поэтому вполне

канскую группу V.Br.011. Ещё одной новой группой стала группа V.Br.009, которую составляет штамм, выделенный от неизвестного хозяина во время вспышки сибирской язвы в Южной Африке в 1939 году.

Линия С включает в себя только группу C.Br.A1055, объединяющую пять штаммов, выделенных в США.

4

ШТАММЫ ИЗ КОТ-Д'ИВУАРА И КАМЕРУНА

Октябрь 2001 года¹. Национальный парк Таи (Tai National Park), Кот-д'Ивуар. Четверо здоровых западноафриканских шимпанзе (*Pan troglodytes verus*) из Северного сообщества покинули основную стаю. Три дня спустя в радиусе 50 метров были обнаружены останки троих шимпанзе, а через шесть недель примерно в 200 метрах был обнаружен и скелет четвёртой особи.

Утром 13 февраля 2002 года в Среднем сообществе около спального гнезда был обнаружен труп молодого самца, который накануне выглядел абсолютно здоровым. На следующий день старший самец этого же сообщества внезапно проявил признаки слабости, после чего у него было несколько эпизодов рвоты. В течение двух часов он умер. Ещё один член этой общины пропал в тот же день. Несмотря на интенсивные поиски, он так и не был обнаружен.

Наконец, в июне того же года неполовозрелый самец из Южного сообщества был найден при смерти менее чем через три часа после того, как его видели абсолютно здоровым. Таким образом, во всех трёх сообществах парка были зафиксированы внезапные смертельные исходы у здоровых, обследованных, особей, причём болезнь явно имела фульминантное течение.

вероятно, что из-за сложностей логистики, а также из-за удалённости заповедника от эндемичных территорий данный гепард не был вакцинирован.

¹ Leendertz F. H., Ellerbrok H., et al. *Anthrax kills wild chimpanzees in a tropical rainforest*. Nature. 2004; 430(6998):451–452; DOI: 10.1038/nature02722.

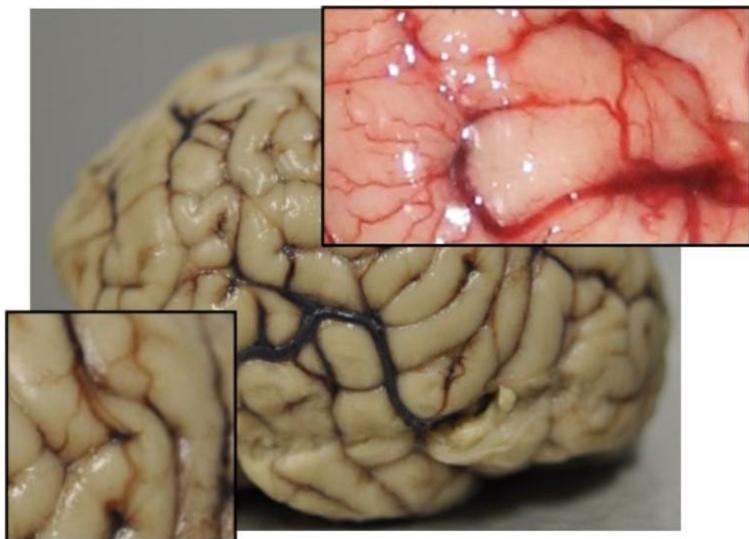


Рис. 4.1. Мозг шимпанзе, поверхностные сосуды которого переполнены кровью; фиксация формалином, на вставке справа мозг до фиксации (по Gräßle T., 2024)

Патологоанатомическое исследование показало наличие геморагий почти во всех внутренних органах, особенно в кишечнике и лёгких, которые также характеризовались отёком и эмфиземой. Поверхностные сосуды головного мозга были переполнены (**Рис. 4.1**), что указывает на воспалительное поражение мозговых оболочек (менингит), приведшее к развитию кортикального сидероза (т. е. отложению метаболитов железа в тканях), который визуализируется в виде двухполосной структуры (**Рис. 4.2**). В тканях селезёнки, печени, лёгких, лимфатических узлов и кишечника были обнаружены грамположительные палочки, которые были отнесены к *B. anthracis* на основании идентификации генетических маркеров *proV* (хромосома), *pag* (плазмиды pXO1) и *capC* (плазмиды pXO2) при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР). При этом вспышек сибирской язвы в этом регионе не регистрировалось, а ДНК сибиреязвенного микроба от шимпанзе ни до, ни после не выделялась. Кроме того, бактерии обнаруживались не только в субарахноидальном пространстве, но и в паренхиме мозга (**Рис. 4.3**), что не свойственно сибиреязвенному микробу.

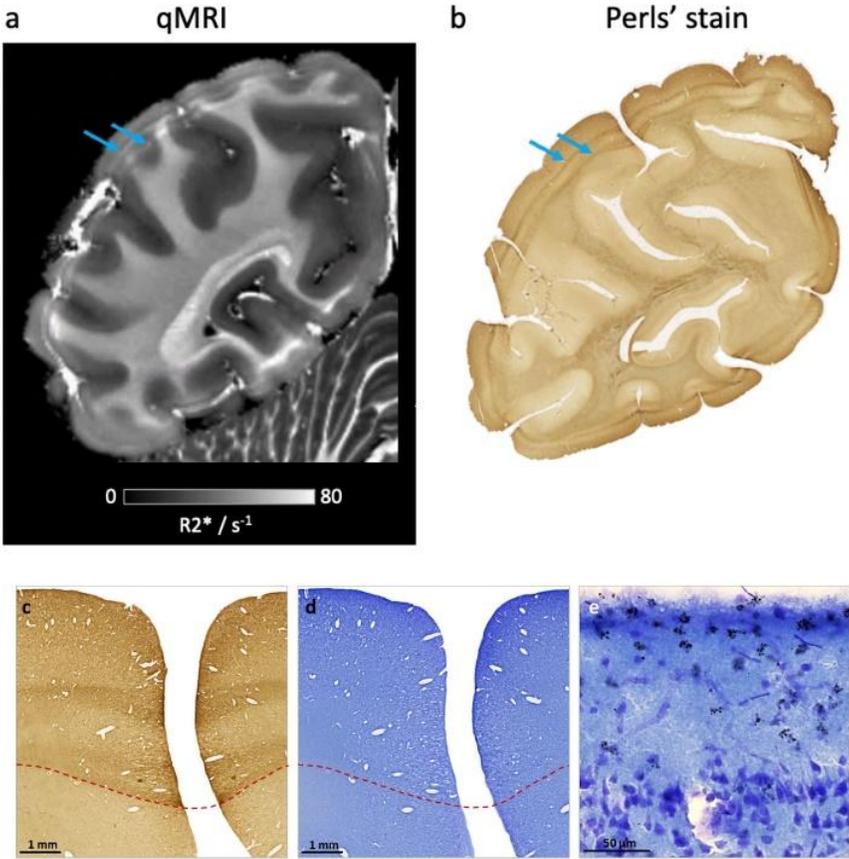


Рис. 4.2. Признаки кортикального сидероза, выявленные с помощью количественной магнитно-резонансной томографии (a; $R2^*$ – эффективная скорость поперечной релаксации) и на гистологическом срезе (b); окраска по Перльсу (в и с), по Нислю (d и e). На $R2^*$ (a) можно видеть гиперинтенсивный двухполосный ободок (стрелки), идущий параллельно поверхности мозга, что указывает на «утечку» железа в ткань, что подтверждается гистологическими срезами (b; стрелки). Причём характерные полосы визуализируются как при окраске по Перльсу на железо (с), так и по Нислю (d), а при большем увеличении (e) можно видеть поверхностный кортикальный сидероз с тёмными гранулами в кортикальном слое I и II (no Gräßle T., 2024)

Похожая история, вероятно, произошла^{<1>} и в Заповеднике фауны Джа (Dja Faunal Reserve), Камерун, где в период с декабря 2004 года по январь 2005 года на территории 35 км² (северная граница заповедника и прилегающий к нему лес Минкебе) были обнаружены останки трёх шимпанзе (*Pan troglodytes troglodytes*) и одной западной равнинной гориллы (*Gorilla gorilla gorilla*), положительные на генетические маркеры сибиреязвенного микроба.

В обоих случаях выдвигалась гипотеза, что *B. anthracis* проник на территории парка и заповедника с заражённой пищей. При этом хотя речь и идёт о различных штаммах – штамм CI (Кот-д’Ивуар) и штамм СА (Камерун), – они образуют отдельную линию F (лесная сибирская язва), поскольку сильно отличаются от «классических» *B. anthracis*^{<2>}. В частности, их хромосома лишена четырёх профаговых областей и однонуклеотидной мутации гена *plcR*, а на плазмиде имеются мутации в генах *pag* и *суа*.

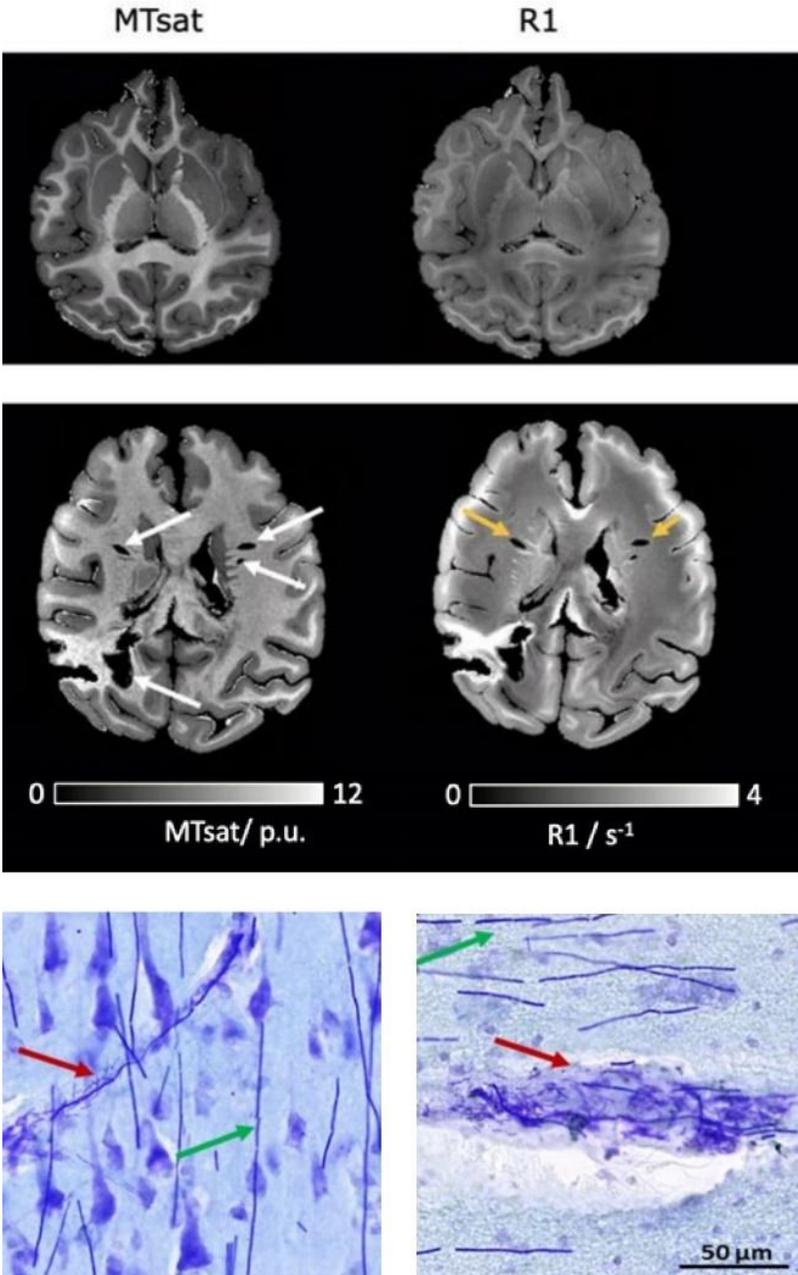
Микробиологическое исследование также выявило ряд отличий. К концу первых суток инкубирования при 37 °С бактерии, как и сибиреязвенные, формировали колонии 5 мм в диаметре с характерной «гривой льва» (завиткообразными выступами по краю)⁽³⁾ и синтезировали капсулу, однако к концу вторых суток колонии уже имели нехарактерный диаметр 10 мм с гладким, блестящим слизистым жёлто-зеленоватым центром (диаметр >5 мм) и сухим, серым, слабо зазубренным краем. Электронная микроскопия отдельных клеток не выявила значительных отличий в морфологии с «классическими» *B. anthracis* (Рис. 4.4), за исключением наличия небольшого количества жгутиков, обеспечивающих подвижность. Кроме того, культуры устойчивы к диагностическому γ-фагу и синтезируют дополнительную капсулу из гиалуроновой кислоты в виде тонких нитей однородной плотности, окружающих поверхность бактерии (Рис. 4.5). Дальнейшие исследования^{<4>} штаммов показали их

¹ Leendertz F. H., Lankester F., et al. *Anthrax in Western and Central African great apes*. Am J Primatol. 2006; 68(9):928–933; DOI: 10.1002/ajp.20298.

² Leendertz F. H., Yumlu S., et al. *A New Bacillus anthracis Found in Wild Chimpanzees and a Gorilla from West and Central Africa*. PLoS Pathog. 2006; 2(1):e8; DOI: 10.1371/journal.ppat.0020008.

³ В англоязычных странах используют термин Medusa head («голова медузы»).

⁴ Klee S. R., Özel M., et al. *Characterization of Bacillus anthracis-Like Bacteria Isolated from Wild Great Apes from Côte d'Ivoire and Cameroon*. J Bacteriol. 2006; 188(15):5333–5344; DOI: 10.1128/JB.00303–06; Klee S. R., Brzuszkiewicz E., et al. *The genome of a Bacillus isolate causing Anthrax in chimpanzees combines*



chromosomal properties of B. cereus with B. anthracis virulence plasmids. PLoS One. 2010; 5(7):e10986; DOI: 10.1371/journal.pone.0010986.

◀ **Рис. 4.3.** Признаки инвазии возбудителя в паренхиме; количественная магнитно-резонансная томография патологического состояния (среднее) в сравнении с контролем (верхнее); параметры: MT_{sat} – насыщение переноса намагниченности, $R1$ – скорость продольной релаксации; окраска по Нисслю (нижнее). Можно видеть признаки гетеролитического повреждения в глубоком белом веществе (белые стрелки), выраженные заполненными жидкостью полостями из-за высокой бактериальной нагрузки, а также на поверхности моза (жёлтые стрелки). На гистологическом исследовании коры головного мозга (левое нижнее) и белого вещества (среднее нижнее) можно видеть внутрисосудистое (красные стрелки) и паренхиматозное (зелёные стрелки) бактериальное присутствие (по Gräßle T., 2024)

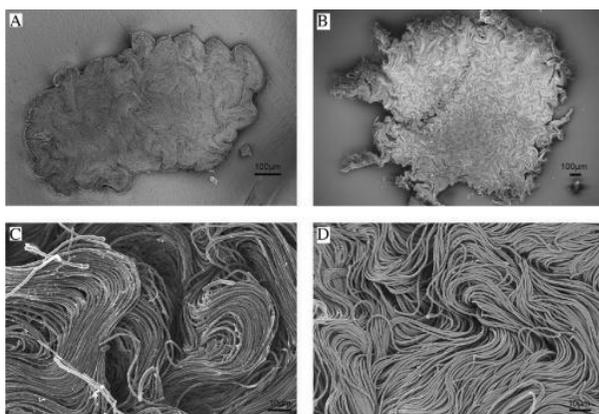
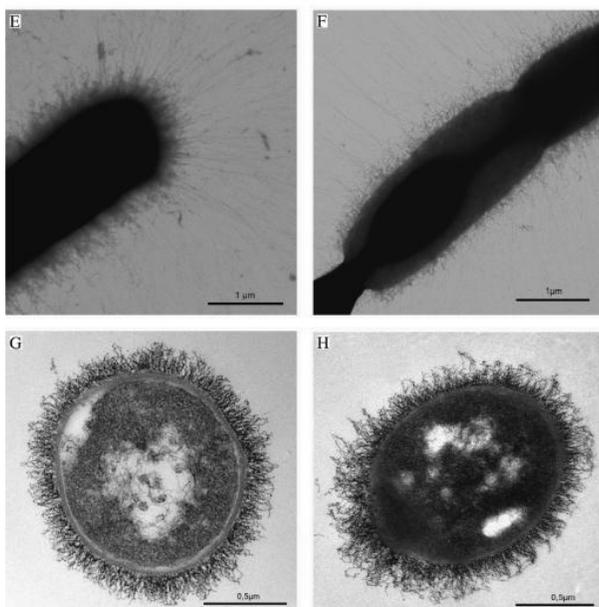


Рис. 4.4. Морфология бактерий, выделенных от обезьян (левый столбик), в сравнении с «классическими» *B. anthracis* (правый столбик); сканирующая (A – F) и трансмиссионная (G и H) электронная микроскопия (по Klee S. R., 2006; публикуется по лицензии the American Society for Microbiology; разрешение передано через the Copyright Clearance Center, Inc.). Сравните их между собой, а также

Рис. 2.8



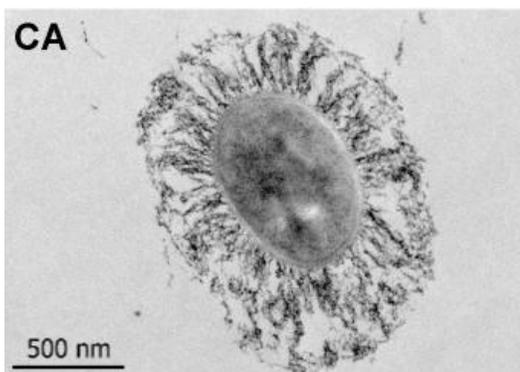


Рис. 4.5. Трансмиссионная электронная микроскопия штамма из Камеруна (CA). Обратите внимание на массивную капсулу, синтезированную бактерией (по Brézillon C., 2015)

большее генетическое отличие от сибиреязвенного микроба. Так, например, штамм CI, помимо плазмид pBCXO1 (ранее pCI-XO1) и pBCXO2 (ранее pCI-XO2), соответственно на 99 и 100 % идентичных плазмидам сибиреязвенного микроба, может дополнительно содержать плазмиду pCI-14, аналогов которой пока

не обнаружено в бактериальном мире и функции которой пока не ясны. Вместе с тем в данном случае важнее сам факт её наличия, поскольку наличие дополнительных плазмид считается характерной чертой ближайших родственников сибиреязвенного микроба, а не его (изолятов *B. anthracis*, содержащих третью плазмиду, пока не обнаружено). Интересно ещё и то, что синтез капсулы из гиалуроновой кислоты кодируется опероном *hasABC*, расположенном на плазмиде pBCXO1, и регулируется геном *atxA* (т. е. тем, что регулирует синтез и капсулы PDGA), поэтому потеря плазмиды pBCXO2 не снижает вирулентность (например, для мышей и морских свинок), чего не скажешь о сибиреязвенном микробе, вирулентность которого значительно снижается с потерей плазмиды pXO2. Более того, наличие капсулы из гиалуроновой кислоты значительно повышает эффективность инвазии (Рис. 4.6). При этом хотя ген *hasA*, отвечающий за синтез гиалуроновой кислоты, и имеется у *B. anthracis*, он содержит делецию, ввиду чего синтез прекращается до капсулообразования.

Хромосома штаммов также преподносит сюрпризы. Она включает шесть уникальных геномных островов (только для острова V имеется соответствующая область у *B. cereus* AN820). Остров IV особенно интересен тем, что он, располагаясь в гене *sigK* (кодирует фактор споруляции σ^K), содержит систему модификации-рестрикции I типа, защищающую бактерию от чужеродной ДНК

(например, ДНК бактериофага). Вполне вероятно, что это способствует более эффективной споруляции, потому что, например, у *B. subtilis* споруляция менее эффективна, а ген *sigK* оборван именно профаговой областью.

Также на хромосоме расположено десять генов, связанных с подвижностью, аналогичных таковым у *B. anthracis*. Однако в отличие от последнего в них отсутствует мутация сдвига рамки считывания, то есть гены функциональны, что и объясняет подвижность. Более того, как и у штамма *B. thuringiensis* ser. *konkukian* 97–27 (изолирован в мае 1995 года¹) от человека с тяжёлым некрозом тканей⁽²⁾, имеется два гена (*fliC1* и *fliC2*), ответственных за синтез флагеллина, участвующего в формировании жгутиков. При этом у *B. cereus* таких генов четыре, а у *B. anthracis* – всего один.

Определённый интерес представляют гены устойчивости к мерсацидину³, которые обнаруживаются лишь у некоторых штаммов *B. cereus*, а также гены системы секреции, в частности локус *secA2*. Дело в том, что он организован точно так же, как аналогичный локус у сибиреязвенного микроба, однако выше него геном организован как у штаммов *B. thuringiensis* и большинства штаммов *B. cereus*, а расположенные ниже области, ответственные за синтез белков S-слоя, – как у *B. cereus*.

Всё это говорит об эволюционном положении этих штаммов не как линии F в рамках внутривидовой филогении *B. anthracis*, как предполагалось ранее, а как «самостоятельных» штаммов, чьё положение определяется между *B. cereus* и *B. anthracis*. Сложно ска-

¹ Hernandez E., Ramise F., et al. *Bacillus thuringiensis* subsp. *konkukian* (serotype H34) superinfection: Case report and experimental evidence of pathogenicity in immunosuppressed mice. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(7):2138–2139; DOI: 10.1128/jcm.36.7.2138–2139.1998.

² Примечательно, что хотя визуально в спорующей культуре фиксировалось наличие кристаллов Вt-токсина, на хромосоме и единственной плазмиде pVT9727 этого штамма отсутствуют гены, кодирующие его синтез, и вполне вероятно, что штамм произошёл от предков линии *anthracis*.

³ Пептидный антибиотик, содержащий бета-метиллантионин и синтезируемый некоторыми представителями рода *Bacillus*. Проявляет активность против грамположительных микроорганизмов, включая метициллин-резистентный золотистый стафилококк (см. Shatterjee S., Shatterjee S., et al. *Mersacidin, a new antibiotic from Bacillus. Fermentation, isolation, purification and chemical characterization.* *J Antibiot* (Tokyo). 1992; 45(6):832–838; DOI: 10.7164/antibiotics.45.832).

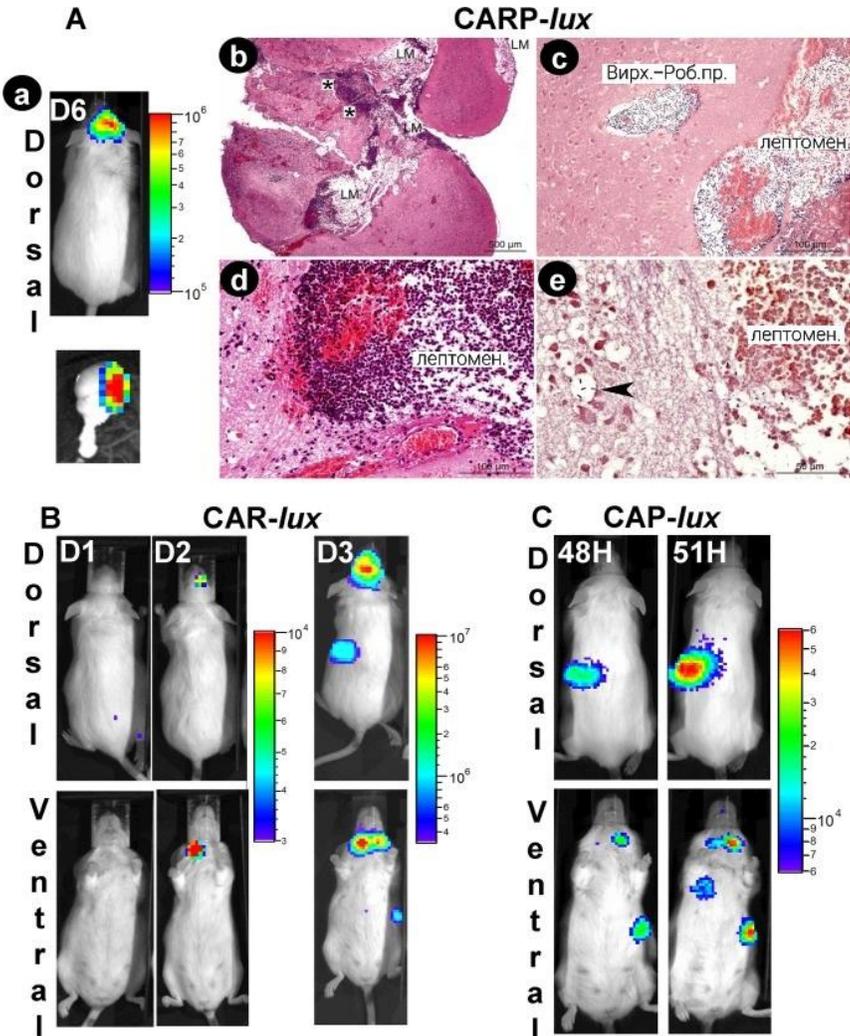


Рис. 4.6. Развитие инфекционного процесса при интраназальном введении спор биолоуминесцентных производных штамма из Камеруна (CA): А – штамм синтезирует только капсулу из гиалуроновой кислоты (1×10^8 спор); В – штамм синтезирует токсины и обе капсулы (1×10^6 спор); С – штамм синтезирует только обе капсулы (1×10^6 спор); мышинная модель; окраска гематоксилин-эозином (Ad и d) и по Граму (Ac и e). Можно видеть, что в случае инфицирования штаммом, синтезирующим токсины и обе капсулы (В), инфекционный процесс начинается в носоглотке и распространяется в дренирующий шейный лимфатический узел (D2), а затем в селезёнку и лёгкие непосредственно перед смертью (не показано), тогда как в случае инфицирования штаммом, синтезирующим только обе капсулы, имеет место системное распространение. В случае ►

зять, как образовались эти штаммы, но принято считать (с определённой достоверностью), что *B. cereus* приобрёл плазмиды в результате горизонтального переноса при прямом контакте (конъюгация) с *B. anthracis* во время коинфекции животного или в почве⁽¹⁾, что выделяет эти штаммы в особый подвид *B. cereus* **bv. anthracis** (Bcbva). Недавние исследования² показывают, что споры Bcbva (*B. cereus* **bv. anthracis**) обнаруживаются в останках дымчатых мангобеев (*Cercocebus atys*) и королевских колобусов (*Colobus polykomos*), павших в парке Таи (Кот-д'Ивуар), а также от горилл, слонов, козлов, мангустовых, обыкновенных шимпанзе (*Pan troglodytes*) и падальных мух (Calliphoridae), что доказывает вовлечённость последних в распространение возбудителя. Причём останки одного дымчатого мангобея из парка Таи относятся к периоду с мая 1993 по август 1994 года, то есть за семь лет до описанных событий, и свидетельствуют, что штаммы Bcbva циркулировали уже в это время.

◀ инфицирования штаммом, синтезирующим только капсулу из гиалуроновой кислоты (A), инфекционный процесс **ограничивается** областью головы и к 6 дню бактерии обнаруживаются в головном мозге (a), исследование тканей которого обнаруживает (b) диффузное воспалительное поражение мягкой и паутинной мозговых оболочек (лептоменингит, LM), мультифокально распространяющееся на паренхиму мозга (звёздочки), а также (c) большое скопление бактерий как в месте воспаления, так и пространствах Вирхова-Робина (т. е. щелевидных пространствах, окружающих сосуды головного мозга). Это поражение также характеризуется (d) множественными кровоизлияниями, отёком и выраженной инфильтрацией нейтрофилов, наличием растяжения (e) мягкой и паутинной оболочек, распространяющегося на мозговую паренхиму с присутствием бактерий в нейропиле (т. е. скопления отростков нервных клеток; наконечник стрелки), что в значительной степени указывает на многоочаговый разрыв или изменение проницаемости гематоэнцефалического барьера. Таким образом, можно видеть существенный вклад капсулы из гиалуроновой кислоты в локальное размножение бактерий (по Brézillon C., 2015)

¹ Было показано экспериментально на примере ризосферы (т. е. узкого слоя земли, прилегающего к растениям), в которой при сокультировании произошла «передача» плазмиды устойчивости к тетрациклину pBC16 от одного штамма сибирязвенного микроба другому (см. Saile E., Koehler T. M. *Bacillus anthracis* multiplication, persistence, and genetic exchange in the rhizosphere of grass plants. Appl Environ Microbiol. 2006; 72(5):3168–3174; DOI: 10.1128/AEM.72.5.3168–3174.2006).

² Norris M. H., Zincke D., et al. *Genomic and phylogenetic analysis of Bacillus cereus biovar anthracis isolated from archival bone samples reveals earlier natural history of the pathogen.* Pathogens 2023; 12(8):1065; DOI: 10.3390/pathogens12081065.

Интересно, что хотя инфицирования людей и не зарегистрировано, антитела к Vcbva обнаруживаются у 10 % лиц, живущих вблизи Национального парка Таи (вполне вероятно, что инфекция протекала латентно).

Нельзя не сказать пару слов о штамме *B. cereus* JF3964, изолированном от крупного рогатого скота, умершего в Коза (Камерун), и первоначально выделенном¹ в кластер D1 в рамках внутривидовой таксономии *B. anthracis*. Однако, несмотря на присутствие плазмид pBCXO1 и pBCXO2, в его геноме отсутствует хромосомный маркер Ba813, характерный для Vcbva и *B. anthracis*, что генетически «ставит» его между ними². Ещё одним таким «промежуточным» штаммом является *B. cereus* ISP3191, изолированный из пищи (специи) в Бельгии. Интересно, что хотя он не имеет плазмиды pBCXO1 (pXO1) и pBCXO2 (pXO2), его единственная плазида содержит многие гены плазмиды pXO1 и некоторые гены pXO2.

Рассматривая хромосому «классического» сибиреязвенного микроба в предыдущей главе, мы уже отмечали её схожесть с близкородственными видами, а сейчас познакомились со штаммами *B. cereus* bv. *anthracis*, имеющими плазмиды, почти идентичные сибиреязвенным. Но это не единичные случаи. Так, штамм *B. cereus* G9241, выделенный в 1994 году в штате Луизиана (США) от сварщика с симптомами ингаляционной сибирской язвы (*сибиреязвенной пневмонии сварщиков*), имеет плазмиды pBCXO1 и pBC210 (ранее pBC218)³, причём первая плазида на 99,6 % идентична плазмиде pXO1 сибиреязвенного микроба, а вторая кодирует синтез экзополисахаридной капсулы, а также токсинов, чья аминокислотная последовательность на 36 и 60 % сходна соответственно с летальным фактором и протективным антигеном *B. anthracis* (в литературе его

¹ Pilo P., Rossano A., et al. *Bovine Bacillus anthracis in Cameroon*. Appl Environ Microbiol. 2011; 77(16):5818–5821. doi: 10.1128/AEM.00074–11.

² Antonation K. S., Grützmacher K., et al. *Bacillus cereus biovar anthracis causing Anthrax in Sub-Saharan Africa – chromosomal monophyly and broad geographic distribution*. PLoS Negl Trop Dis. 2016; 10(9):e0004923; DOI: 10.1371/journal.pntd.0004923.

³ Разница в названии связана с тем, что первоначально размер плазмиды был определён как 218 Кб, что и послужило основанием для названия «pBC218». Однако последующие исследования показали, что её размер составляет 210 Кб, ввиду чего название было изменено на «pBC210» (см. Hoffmaster A. R., Ravel J., et al. *Identification of anthrax toxin genes in a Bacillus cereus associated with an illness resembling inhalation anthrax*. PNAS. 2004; 101(22):8449–8454; DOI: 10.1073/pnas.0402414101).

иногда именуют *ser-thrax*). Кроме того, она несёт гены *atxA2* и *ragA2*, получившие своё название из-за способности кодировать синтез белка, подобного протективно-му антигену *B. anthracis* (напомним: кодируется геном *ragA*). В геноме присутствует ещё и третий внехромосомный элемент – линейная плаزمида *pBFH_1* (ранее *pVClIn29*), несущая гены профага, индуцируемые действием температуры, то есть культивирование при 37 °С (температура млекопитающего) инициирует сборку вирионов, причём только в субкультурах, ввиду чего первых можно обнаружить в культуральной жидкости (Рис. 4.7).

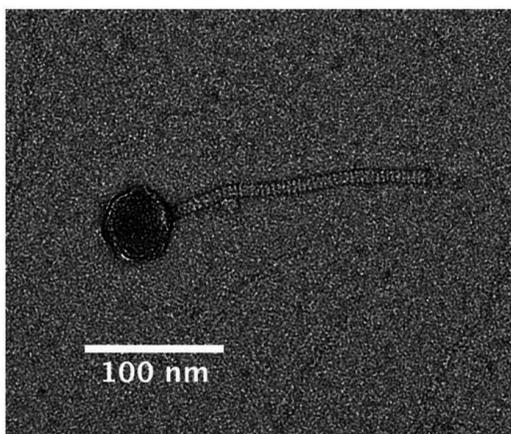


Рис. 4.7. Вирион бактериофага *pBFH_1*, трансмиссионная электронная микроскопия (по Taylor-Joyce G., 2023)

Удивительной особенностью этого штамма является то, что, несмотря на наличие сибиреязвенного токсина (причём в том или ином виде кодируемого генами сразу двух плазмид!), подвижность, толстую капсулу и способность вызывать лёгочную инфекцию у людей (преимущественно сварщиков¹), он оказывается авирулентным для новозеландских белых кроликов при подкожном введе-

¹ Поскольку болезнь встречается только у сварщиков, нельзя исключать вклад повреждения лёгких, связанного с профессиональной деятельностью. По крайней мере имеются сведения, что сварщики в целом более подвержены респираторным заболеваниям, чем остальные группы населения (см. Marongiu A., Hasan O., et al. *Are welders more at risk of respiratory infections? Findings from a cross-sectional survey and analysis of medical records in shipyard workers: the WELSHIP project.* Thorax. 2016; 71(7):601–606; DOI: 10.1136/thoraxjnl-2015-207912). Косвенным подтверждением этой мысли может служить клинический случай, произошедший в штате Техас (США) в 2011 году, когда штамм *B. cereus* E1c2, содержащий только одну плазмиду *pVCXO1*, привёл к лёгочной форме и летальному исходу у 39-летнего мужчины, занимающегося дома сваркой (см. Wright A. M., Beres S.B., et al. *Rapidly progressive, fatal, inhalation Anthrax-like infection in a human: case report, pathogen genome sequencing, pathology, and coordinated response.* Arch Pathol Lab Med. 2011; 135(11): 1447–1459; DOI: 10.5858/2011-0362-SAIR.1).

нии⁽¹⁾. Конечно, тут можно возразить, что штамм у человека вызывает пневмонию и, вероятно, эволюционно сформировал механизмы именно для лёгочной инвазии, однако опыты⁽²⁾ показывают, что он также почти авирулентен и при заражении интраназально (через аэрозольные капли), поскольку, чтобы вызвать летальный исход инфекции у кролика, необходима доза в 100 раз больше, чем для штаммов *B. anthracis*!

Ещё одной интересной особенностью штамма является наличие на хромосоме как характерной для *B. cereus* области *plcR*, кодирующей синтез токсинов (в частности, гемолизина А, ВL, II и III), так и характерного для *B. anthracis* гена *atxA*, хотя и непонятно, как они «уживаются» вместе. Внимательные уже думают, что тут ошибка, ведь у сибиреязвенного микроба *atxA* расположен на плазмиде рХО1. Но дело в том, что плазида рВСХО1 несёт лишь похожий ген *atxA1*, поэтому она не играет роли в уникальном «сосуществовании» данных генов на хромосоме, которое приводит к тому, что при 25 °С штамм проявляет гемолитическую и цитолитическую активность, чего не наблюдается при 37 °С. Однако именно при последней температуре плазида рВСХО1 замедляет работу хромосомных генов, участвующих в метаболизме, но ускоряет гены, кодирующие синтез мембранных белков. Кроме того, ускоряется и процесс споруляции, однако пока непонятно, какими генетическими элементами это управляется. Таким образом, штамм ведёт как бы двойную жизнь, переключаясь при увеличении температуры от фенотипа *B. cereus* к фенотипу *B. anthracis*, поэтому его именуют **кроссоверным (cross-over)**.

Подобных штаммов обнаружено немного, поскольку лишь некоторые штаммы, выделенные от сварщиков, являются кроссоверными. Так, штаммы ST108, G9898 и ST78, также выделенные от сварщиков с сибиреязвенной пневмонией соответственно в 2020

¹ Примечательно, что штаммы Bcbva, напротив, способны вызвать у них заболевание при интраназальном введении, а летальные дозы аналогичны сибиреязвенным (см. Ferris A. M., Dawson D. G., et al. *Bacillus cereus* biovar *anthracis* causes inhalational anthrax-like disease in rabbits that is treatable with medical countermeasures. PLoS Negl Trop Dis. 2025; 19(4):e0012973; DOI: 10.1371/journal.pntd.0012973).

² Wilson M. K., Vergis J. M., et al. *Bacillus cereus* G9241 makes anthrax toxin and capsule like highly virulent *B. anthracis* Ames but behaves like attenuated toxigenic nonencapsulated *B. anthracis* Sterne in rabbits and mice. Infect Immun. 2011;79(8):3012–3019; DOI: 10.1128/IAI.00205–11.

году в штате Техас (США), в 1996 и 2020 годах в штате Луизиана (США), хотя и имеют гены сибиреязвенного токсина *суа*, *lef* и *pagA*, вовсе не несут ген *atxA*. При этом хромосома первого штамма наиболее близка *B. anthracis*, а второго и третьего – *B. tropicus*.

Говоря о *B. tropicus*, нельзя не упомянуть штаммы JMT, впервые^{<1>} выделенные в середине прошлого века от людей с *прибрежной лихорадкой* и от мелких млекопитающих, для которых заражение ими смертельно. Начиная с 2011 года на некоторых фермах в провинции Гуандун (Китай) и на острове Тайвань регистрируется смерть китайских триониксов (*Pelodiscus sinensis*), вызванная указанными штаммами, которых изначально по результатам ПЦР диагностики отнесли к видам *B. cereus* и *B. thuringiensis*. Однако симптомы заболевания у этих черепах свидетельствовали не о кишечной инфекции, обычно вызываемой штаммами *B. cereus*, а о системной (при этом микроскопия спор не обнаруживает характерных для *B. thuringiensis* параспоральных тел). Дальнейшие исследования^{<2>} отнесли эти штаммы к виду *B. tropicus*, однако показали, что на единственной плазмиде присутствуют гены сибиреязвенного токсина *суа* и *pagA* (отёчный фактор и протективный антиген), а также гены, кодирующие синтез гиалуроновой кислоты и экзополисахарида (как у штамма *B. cereus* G9241).

Таким образом, в штаммах близкородственных видов могут встречаться не только почти идентичные сибиреязвенные плазмиды, но и их отдельные гены. Интересно, что в штаммах *B. cereus* D-17, *B. cereus* ATCC 43881 и *B. thuringiensis* ATCC 33679 обнаруживается более половины ORF плазмиды рХО1, а в штамме *B. cereus* ATCC 10987 – лишь 40 % нуклеотидной идентичности, в которой уже отсутствуют гены острова патогенности. В штамме *B. thuringiensis* AWO06 обнаруживаются гены плазмиды рХО2, а штаммы CBD 118 и CBD 119, относящиеся к неродственному сибиреязвенному микробу виду *B. circulans* и неопознанному виду, на 97 % идентичному *B. luciferensis* соответственно, несут лишь 10 генов плазмиды рХО2.

¹ Heaslip W. *Bacillus tropicus*, a new species isolated from man and animals described and compared with other *Bacilli* resembling *Bacillus anthracis*. Med J Australia. 1941; 2(19):536–543; DOI: 10.5694/j.1326–5377.1941.tb54246.xopen_in_new.

² Tsai J.-M., Kuo H.-W., et al. *Retrospective Screening of Anthrax-like Disease Induced by Bacillus tropicus* str. JMT from Chinese Soft-Shell Turtles in Taiwan. Pathogens. 2023; 12(5):693; DOI: 10.3390/pathogens12050693.

Однако и с самими плазмидами *B. anthracis* не всё так просто. Остров патогенности плазмиды рХО1, например, включает два кластера генов, заслуживающих особого внимания. Первый – это кластер генов прорастания *gerXA* (ORF 113), *gerXB* (ORF 114) и *gerXC* (ORF 112), кодирующих белки, сходные с таковыми у *B. subtilis*¹, *B. cereus* и *B. megaterium*. Важно подчеркнуть, что в случае последних речь идёт о хромосомных генах! Примечательно, что указанные белки обеспечивают прорастание споры в альвеолярных макрофагах, то есть они строго специфичны (за дальнейшее выживание отвечают отёчный и летальный факторы).

Гены второго кластера (ORF 93, ORF 94 и ORF 95) похожи на гены *hasA*, *hasB* и *hasC*, участвующие в синтезе серотип-специфической полисахаридной капсулы вирулентных стрептококков группы А. Конечно, у сибиреязвенного микроба полисахаридная капсула не обнаружена и эти гены принято считать нефункциональными. Подтверждают эту мысль как и описанные ранее штаммы С1 и СА, так и исследование² уже упомянутого штамма *B. cereus* G9241, которое показало, что ген *hasACB* плазмиды рВСХО1 кодирует синтез капсулы из гиалуроновой кислоты (т. е. дисахаридного полимера), а ген *bpsX-H* плазмиды рВС210 – синтез экзополисахарида (от англ. *Bacillus cereus* *exo-polysaccharide*), что в совокупности обеспечивает устойчивость бактерий к фагоцитозу и обуславливает их способность вызывать заболевание, похожее на ингаляционную форму сибирской язвы. При этом напомним, что ген *hasA* имеется у *B. anthracis*, но содержит делецию, ввиду чего синтез гиалуроновой кислоты прекращается до капсулообразования.

Интересной особенностью плазмиды рХО1 является также сравнительно небольшой средний размер её ORF – всего 610 п. н., что поразительно схоже с размерами ORF (507 п. н.) у плазмид *Borrelia burgdorferi*, возбудителя болезни Лайма, чья значительная часть ге-

¹ Вместе с тем *gerA*, *gerB*, *gerK* и *yfk* у *B. subtilis* являются оперонами, кодирующими по три гена (то есть *gerA* включает *gerA*, *gerAB* и *gerAC*), тогда как все три *ger*-гена *B. anthracis* принадлежат только к одному оперону.

² Oh S.-Y., Budzik J. M., et al. *Two capsular polysaccharides enable Bacillus cereus G9241 to cause anthrax-like disease*. Mol Microbiol. 2011; 80(2):455–470; DOI: 10.1111/j.1365–2958.2011.07582.x.

нов повреждена (стала псевдогенами). И хотя¹ достоверно неизвестно, протекает ли эволюция *B. anthracis* тем же путём, высказывается предположение, что как минимум часть нефункционирующих генов находится на грани вымирания, однако этот процесс «застрял» в медленной эволюции возбудителя (медленность эволюции обусловлена долгим пребыванием в состоянии спор).

Всё вышесказанное указывает на высокое сходство геномов сибирезвенного микроба и его ближайших родственников, а дальнейшие генетические исследования^{(2) < 3 >} привели к пониманию *B. anthracis*, *B. cereus* и *B. thuringiensis* как членов группы одного вида – *B. cereus*, который именуется ***Bacillus cereus complex*** или ***Bacillus cereus sensu lato*** (*B. cereus* sl), то есть «в широком смысле».

Следует оговориться, что выделение группы *B. cereus complex* не было утверждено Международным комитетом по систематике прокариот, однако принято научным сообществом. Группа включает не менее восьми видов, поскольку из-за крайней запутанности внутригрупповой таксономии только по восьми видам существует некий консенсус, тогда как вопрос включения других⁴ является предметом споров⁽⁵⁾. К этим видам относят *B. anthracis*, *B. cereus* sen-

¹ Okinaka R. T., Cloud K., et al. *Sequence and organization of pXO1, the large Bacillus anthracis plasmid harboring the anthrax toxin genes*. J Bacteriol. 1999; 181(20):6509–6515; DOI: 10.1128/jb.181.20.6509–6515.1999.

² Дело в том, что до эры молекулярно-генетических исследований классификация строилась в основном на схожести образа жизни (патогенности) и морфологии колоний. Так, например, *B. anthracis* и *B. cereus* считались различными видами, в том числе из-за высокой патогенности первого и способности формировать характерные «восковые» колонии второго, из-за чего он и получил своё название (от лат. cera – «воск»).

³ Helgason E., Okstad O. A., et al. *Bacillus anthracis, Bacillus cereus, and Bacillus thuringiensis – one species on the basis of genetic evidence*. Appl Environ Microbiol. 2000; 66(6):2627–2630; DOI: 10.1128/AEM.66.6.2627–2630.2000.

⁴ Среди них ранее упомянутый *Bacillus tropicus*, а также *Bacillus paranthracis*, *Bacillus pacificus*, *Bacillus albus*, *Bacillus mobilis*, *Bacillus luti*, *Bacillus proteolyticus*, *Bacillus nitratireducens* и *Bacillus paramycoides* (см. Liy Y., Du J., et al. *Proposal of nine novel species of the Bacillus cereus group*. Int J Syst Evol Microbiol. 2017; 67(8):2499–2508; DOI: 10.1099/ijsem.0.001821).

⁵ Высказываются предложения как считать всю группу одним полиморфным видом, состоящим из групп штаммов, отличающихся между собой наличием определённых детерминант патогенности и регуляторных генов, так и выделить в рамках группы 20 и более видов.

su stricto (*B. cereus* ss), то есть «в узком смысле», *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. cytotoxicus* и *B. toyonensis*¹⁾.

Выделение новых видов, как правило, основывается на *in silico* (компьютерных) расчётах *средней идентичности нуклеотидов* – ANI (от англ. average nucleotide identity). Суть этого метода, предложенного²⁾ в 2005 году, заключается в фрагментации последовательности генома, полученной по данным полногеномного секвенирования, на фрагменты определённой длины, последующем сравнении полученных фрагментов с эталонным геномом и вычислении среднего процента совпадений идентичных пар. Тогда если два генома имеют значение ANI выше установленного «порога», то они считаются членами одного *геновида*. Однако остаётся открытым вопрос, какое значение считать пороговым.

На практике значения ANI обычно находятся выше 80, потому что для разделения видов порога в 80 ANI (т. е. до 80%-ного совпадения) вполне достаточно, чего нельзя сказать о представителях *B. cereus* complex. Так, если мы в качестве порога возьмём 92,5 ANI³⁾, то вид *B. anthracis* станет подвидом нового полиморфного вида *B. mosaicus* (получил своё название, поскольку объединил несколько видов), а если поднимем порог до 95 ANI⁴⁾, то часть штаммов *B. cereus*, вызывающих сибиреязвенноподобные состояния, «отойдёт» *B. tropicus*. Происходит это из-за того, что штаммы, обозначенные как «типичные», не всегда генетически «центральны». Кроме того, определённую путаницу вносит и учёт фенотипа, который

¹⁾ *B. subtilis* не вошёл в группу, поскольку имеет отличную организацию генома (см. Økstad O. A., Hegna I., et al. *Genome organization is not conserved between Bacillus cereus and Bacillus subtilis*. Microbiology (Reading). 1999; 145 (Pt 3):621–631; DOI: 10.1099/13500872-145-3-621; Wunschel D., Fox K. F., et al. *Discrimination among the B. Cereus group, in comparison to B. subtilis, by structural carbohydrate profiles and ribosomal rRNA spacer region PCR*. Systematic and Applied Microbiology. 1995; 17(4):625–635; DOI: 10.1016/S0723–2020(11)80085–8). Вместе с тем именно штаммы *B. subtilis* повсеместно используются для работ по клонированию генов, созданию вакцин и т. д.

²⁾ Konstantinidis K. T., Tiedje J.M. *Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes*. PNAS. 2005; 102(7):2567–2572; DOI: 10.1073/pnas.0409727102.

³⁾ Carroll L. M., Wiedmann M., et al. *Proposal of a taxonomic nomenclature for the Bacillus cereus group which reconciles genomic definitions of Bacterial species with clinical and industrial phenotypes*. mBio. 2020; 11(1):e00034–20; DOI: 10.1128/mBio.00034–20.

⁴⁾ Carroll L. M., Cheng M., et al. *Keeping up with the Bacillus cereus group: taxonomy through the genomics era and beyond*. Crit Rev Food Sci Nutr. 2022; 62(28):7677–7702; DOI: 10.1080/10408398.2021.1916735.

может совпадать у штаммов нескольких геномовидов и отличаться среди штаммов одного геномовида.

Вместе с тем сторонников подхода, предлагающего считать штамм принадлежащим геномовиду, если его геном имеет $\geq 92,5$ ANI с геномом типового штамма¹ этого геномовида, становится в научном сообществе всё больше. В рамках него внутривидовая таксономия принимает следующий вид²:

Таксономическая единица:	Типовой штамм:
Геномовид (I) <i>B. pseudomycooides</i>	DSM 12442
(II) <i>B. paramycooides</i>	NH24A2
(III) <i>B. mosaicus</i>	N35–10–2 (<i>B. albus</i>) Ames (<i>B. anthracis</i>) 0711P9–1 (<i>B. mobilis</i>) EB422 (<i>B. pacificus</i>) MN5 (<i>B. paranthracis</i>) N24 (<i>B. tropicus</i>) FSL W8–0169 (<i>B. wiedmanni</i>)
(IV) <i>B. cereus</i> ss	ATCC 14579 (<i>B. cereus</i> ss) ATCC 10792 (<i>B. thuringiensis</i>)
(V) <i>B. tyonensis</i>	BCT-7112
(VI) <i>B. mycooides</i>	DSM 2048 4049 (<i>B. nitratireducens</i>) WSBC 10204 (<i>B. weihenstephanensis</i>)

¹ То есть штамма, геном которого признан эталонным для данного геномовида и в сравнении с которым определяют, относится изучаемый геном к данному геномовиду или нет.

² Carroll L. M., Wiedmann M., et al. *Proposal of a taxonomic nomenclature for the Bacillus cereus group which reconciles genomic definitions of Bacterial species with clinical and industrial phenotypes.* mBio. 2020; 11(1):e00034–20; DOI: 10.1128/mBio.00034–20; Carroll L. M., Cheng M., et al. *Keeping up with the Bacillus cereus group: taxonomy through the genomics era and beyond.* Crit Rev Food Sci Nutr. 2022; 62(28):7677–7702; DOI: 10.1080/10408398.2021.1916735.

	(VII) <i>B. cytotoxicus</i>	NVH 391–38
	(VIII) <i>B. luti</i>	TD 41
	(IX) “ <i>B. bingmayongensis</i> ”	FJAT-13831
	(X) “ <i>B. gaemokensis</i> ”	KCTC 13318
	(XI) “ <i>B. manliponensis</i> ”	JCM 1580
	(XII) “ <i>B. clarus</i> ”	ATCC 21929
	(XIII) “ <i>B. chihchuchen</i> ”	QF108–045
Подвид	subsp. <i>Anthraxis</i>	(≥ 99,9 ANI штамма Ames)
	subsp. <i>cereus</i>	(≥ 97,5 ANI штамма AH187)
Биовар	bv. <i>Anthraxis</i>	(синтезирует сибиреязвенный токсин или имеет гены <i>csa</i> , <i>lef</i> и <i>pagA</i>)
	bv. <i>Emeticus</i>	(синтезирует цереулид или имеет гены <i>cesABCD</i>)
	bv. <i>Thuringiensis</i>	(синтезирует один или несколько Bt-токсинов)

Таким образом, в рамках данной таксономии выделяют 8 геномовидов (*mosaicus*, *cereus* ss, *mycoides*, *paramycoides*, *pseudomycoides*, *cytotoxicus*, *luti* и *toyonensis*) и 4 кандидатных «эффективных вида»¹ (“*bingmayongensis*”, “*clarus*”, “*gaemokensis*”, “*manliponensis*” и “*chinhchuchen*”²). При этом возбудитель сибирской язвы (*B. anthracis*) отнесён к геномовиду *B. mosaicus*, что вносит определённые сложности, например, при изучении научной литературы клиницистами. Кроме того, это потребует пересмотра всех нормативных и методических документов при том, что с точки зрения практического здравоохранения идентичность нуклеотидов **не может** превалировать над способностью вызывать конкретное заболевание. Вместе с тем, по-видимому, авторы классификации решили несколько

¹ Обратите внимание, что они записываются в кавычках, поскольку выделены пока только в рецензируемых журналах.

² Выделен в 2023 году (см. Cheng L.-W., Byadgi O. V., et al. *Pathogenicity and genomic characterization of a novel genospecies, Bacillus shihchuchen, of the Bacillus cereus group isolated from Chinese softshell Turtle (Pelodiscus sinensis)*; Int J Mol Sci. 2023; 24(11):9636; DOI: 10.3390/ijms24119636). Подробнее об этом геномовиде и его типовом штамме поговорим в Главе 9.

«сгладить углы» путём выделения подвидов и биоваров. Так, штамм *B. anthracis*, разделяющий с типовым штаммом Ames минимум 99,9 ANI и(или) имеющий фенотипические характеристики, отличающие его от *B. cereus* ss (например, отсутствие подвижности), они предлагают относить к *B. mosaicus* subsp. *anthracis*, а если штамм синтезирует сибиреязвенные токсины и(или) имеет гены, их кодирующие (*csa*, *lef* и *pagA*), – к *B. mosaicus* subsp. *anthracis* bv. *Anthracis*. При этом подвид возможно записывать кратко как *B. anthracis*, а биовар – как *B. anthracis*, чтобы не вступать в противоречие с историческим названием (но попробуйте не запутаться с курсивом).

Важно ещё отметить, что капсульные гены намеренно исключены, чтобы избежать ситуации, когда вызывающий сибирскую язву штамм имеет иную капсулу (например, эксаполисахаридную). То есть сюда предлагается относить ранее упомянутые кроссоверные штаммы *B. cereus* G9241, ST108, G9898 и ST78, но не штаммы *B. tropicus* JMT, поскольку последние не имеют гена *lef* (кодирует синтез летального фактора). Всё это явно добавляет путаницы ввиду необходимости держать в голове всю эту информацию. Конечно, для лабораторного исследования конкретного штамма сложностей не прибавится, но они точно возникнут у эпидемиологов, клиницистов и научных сотрудников, поскольку вполне вероятно, что одни специалисты будут относить эти штаммы к *B. anthracis*, а другие – к *B. cereus*.

Что касается подвида *cereus*, то ситуация обстоит похожим образом. Те штаммы, что ранее были известны как «рвотные» *B. cereus*, обладающие генами цереулидсинтетазы (*cesABCD*), не принадлежащие к геномовиду *B. mycoides*, но разделяющие с типовым штаммом AN187 минимум 97,5 ANI, предложено относить к *B. mosaicus* subsp. *cereus*, что кратко может быть записано как *B. cereus*. Однако не совсем понятна история с биоваром Emeticus (кратко *B. Emeticus*), поскольку относящимся к нему является штамм, если он просто синтезирует цереулид или обладает генами цереулидсинтетазы (*cesABCD*), т. е. без значений ANI, а в качестве примеров таких штаммов указываются *B. mosaicus* subsp. *cereus* («рвотный» *B. cereus*) и *B. mycoides* («рвотный» *B. weihenstephanensis*).

К биовару *Thuringiensis* предложено относить штаммы, синтезирующие один или несколько Vt-токсинов, то есть штаммы, известные исторически как *B. thuringiensis*.

С другой стороны, поскольку, как уже говорилось, внутривидовая таксономия не утверждена Международным комитетом по систематике прокариот, существуют и другие подходы. Например, протоколом ВАМ (от англ. Bacteriological Analytical Manual) предлагается использование микробиологических и биохимических тестов для отнесения штамма к *B. cereus* complex без необходимости проведения полногеномного секвенирования. В этом случае группа включает пять видов: *B. anthracis*, *B. cereus* ss, *B. thuringiensis*, *B. mycoides* и *B. weihenstephanensis*¹. Несмотря на всю простоту и доступность, а также привычность исследования фенотипа в лабораторной практике, этот подход исключает из группы общепринятые виды *B. pseudomycooides*, *B. cytotoxicus* и *B. toyonensis*.

Таксономия, предложенная Национальным центром по биотехнологической информации (National Center for Biotechnology Information), на начало 2024 года содержит уже 24 вида: *B. albus*, *B. anthracis*, *B. bombysepticus*, *B. cereus* ss, *B. clarus*, *B. cytotoxicus*, *B. dicomae*, *B. gaemokensis*, *B. hominis*, *B. luti*, *B. manliponensis*, *B. mobilis*, *B. mycoides*, *B. nitratedreducens*, *B. pacificus*, *B. paramobilis*, *B. paramycoides*, *B. paranthracis*, *B. proteolyticus*, *B. pseudomycooides*, *B. thuringiensis*, *B. toyonensis*, *B. tropicus*, *B. wiedmanni*.

Анализ вариабельности консервативных генов, то есть изучение изменчивости тех генов, что медленнее других накапливают мутации (их ещё называют генами домашнего хозяйства), осуществляемый с помощью монолокусного (SLST, от англ. single locus sequence

¹ Выделен в 1998 году на основе анализа генома психрофильных штаммов *B. cereus* и *B. mycoides*, растущих при температуре 4–7 °С (в гене белков холодового шока *cspA* в позиции 4 имеется замена А→G). Назван по местности Вайенштефан на юге Германии, где типовой штамм (WSBC 10204^T) был изолирован из молока (см. Lechner S., Mayr R., et al. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. Int J Syst Bacteriol. 1998; 4:1373–1382; DOI: 10.1099/00207713-48-4-1373). Однако в 2018 году рядом исследователей отнесён к *B. mycoides*, поскольку метаболические, физиологические и хемотаксономические характеристики типового штамма *B. weihenstephanensis* совпадают с таковыми у *B. mycoides* (см. Liu Y., Lai Q., et al. *Genome analysis-based reclassification of Bacillus weihenstephanensis as a later heterotypic synonym of Bacillus mycoides*. Int J Syst Evol Microbiol. 2018; 68(1):106–112; DOI: 10.1099/ijsem.0.002466).

typing) и мультилокусного (MLST, от англ. multilocus sequence typing) секвенирования, также применяется для внутривидовой таксономии. Чаще всего выбирают общие для филогенетической группы гены, которые, однако, не кодируют факторы вирулентности и патогенности¹. Так, для SLST-типирования была предложена² последовательность гена пантоат-β-аланилигазы *panC*, аллельный полиморфизм которой позволил разделить штаммы представителей *B. cereus* complex на генетические группы. К I и II группам относят соответственно штаммы *B. pseudomycoloides* и *B. wiedmannii*. К III группе – штаммы *B. anthracis* с частью штаммов *B. thuringiensis* и эмметическими («рвотными») штаммами *B. cereus* ss, тогда как остальные штаммы *B. thuringiensis* и *B. cereus* ss отнесены к IV группе. К V группе отнесены штаммы *B. toyonensis*, к VI группе – штаммы *B. mycoloides* и *B. weihenstephanensis*, а к VII группе – штаммы *B. cytotoxicus*. Примечательно, что штаммы этих групп также разделяются по так называемым термальным нишам (thermal niches). В частности, большая часть штаммов, входящих в группы II, V и VI, способна расти при температурах ниже 8 °С, тогда как большая часть штаммов, входящих в группы III и VII, наоборот, растут при 45–50 °С. Штаммы из группы I и IV способны расти в более широком диапазоне температур (10–43 °С). Всё это указывает на эволюционное приспособление штаммов к новым условиям: переход от термотолерантности (при 50 °С способны расти только штаммы VII группы) к психрофильности (при 5 °С способны расти только штаммы VI группы), то есть произошедший миллионы лет назад выход из ограниченной термальной ниши, характеризующейся высокой температурой (термальный источник, вулканическая почва), к более низким, таким как животные и невулканические почвы, и далее вплоть до арктических регионов.

¹ Понятия «вирулентность» (т. е. способность выжить в макроорганизме), «патогенность» (т. е. разрушительность для макроорганизма) и «восприимчивость» (т. е. способность макроорганизма заразиться), как справедливо отметил советский врач, бактериолог Игорь Валериянович Домарадский (1925–2009), «нельзя отделять одно от другого, и если это делается, то только в методологических целях». При этом надо сказать, что список факторов (детерминант) вирулентности и патогенности со временем меняется.

² Guinebretière M.-H., Thompson F. L., et al. *Ecological diversification in the Bacillus cereus Group*. Environ Microbiol. 2008; 10(4):851–865; DOI: 10.1111/j.1462-2920.2007.01495.x.

Для MLST-типирования предложены¹ гены *glp*, *gmk*, *ilv*, *pta*, *pur*, *pus* и *tpi*, сравнение которых также разделило штаммы представителей *B. cereus* complex на первую кладу, включающую штаммы *B. anthracis*, многочисленные штаммы *B. cereus* ss и редкие штаммы *B. thuringiensis*; вторую кладу, включающую большинство штаммов *B. thuringiensis* вместе с некоторыми штаммами *B. cereus* ss; и третью кладу, к которой отнесли штаммы всех остальных представителей группы.

Вместе с тем к полученным на основе SLST- и MLST-типирования данным следует относиться с определённой долей скепсиса. Было показано², что некоторые штаммы *B. mycoides* можно отнести к первой и второй кладам, а среди штаммов *B. cereus* ss и *B. thuringiensis* встречаются психрофилы, несущие гены *glpF*, *gmk*, *purH* и *tpi*, специфичные для *B. weihenstephanensis* (VI группа).

Подводя итог сказанному, следует обозначить два важных момента. **Первый.** Выделенный ещё во времена Роберта Коха микроб, именуемый *B. anthracis*, хотя и занимает особенное положение в исторической памяти человечества ввиду способности вызывать особо опасное заболевание, de facto является членом сложной группы, в которую входят вполне безобидные виды и которая, с определённой долей допущения, является одним видом. **Второй.** Внутригрупповая таксономия настолько сложна и запутанна³, что вызывает множественные споры, однако с точки зрения человеческого существования наиболее важными являются токсигенные *B. anthracis* и *B. cereus* ss как вызывающие заболевания человека и животных, *B. mycoides* как вызывающий некротические поражения у

¹ Priest F. G., Barker M., et al. Population structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. J Bacteriol. 2004; 186(23):7959–7970; DOI: 10.1128/JB.186.23.7959–7970.2004.

² Soufiane B., Côté J.-C. *Bacillus weihenstephanensis* characteristics are present in *Bacillus cereus* and *Bacillus mycoides* strains. FEMS Microbiol Lett. 2013; 341(2):127–137; DOI: 10.1111/1574-6968.12106.

³ При сравнении всё тех же генов домашнего хозяйства выясняется, что некоторые серовары *B. thuringiensis* имеют общую филогению с другими представителями *B. cereus* complex, в частности, серовары *navarrensis*, *bolivia* и *vazensis* имеют общую филогению с *B. weihenstephanensis*, который позже был отнесён к *B. mycoides* (см. Soufiane B., Baizet M., et al. Multilocus sequence analysis of *Bacillus thuringiensis* serovars *navarrensis*, *bolivia* and *vazensis* and *Bacillus weihenstephanensis* reveals a common phylogeny. Antonie Van Leeuwenhoek. 2013; 103(1):195–205; DOI: 10.1007/s10482-012-9800-5).

некоторых рыб, а также токсигенный для насекомых *B. thuringiensis*, который на практике часто применяется в качестве биоинсектицида (и потенциально способен вызывать токсикоинфекции у человека, о чём подробнее поговорим в Главе 31).

Далее, говоря о членах группы *B. cereus complex*, мы будем использовать исторические названия, а также, где это необходимо, указывать предлагаемые новые.

Раздел II

Bacillus anthracis

Говорят, что всё в мире пребывает в равновесии: горячее и холодное, добро и зло, инь и ян. Поэтому после сложных историй о генах, эволюции и таксономии поговорим о чём-то простом и приятном, например, о зебрах.

Феномен частичной миграции, при котором мигрирует не вся популяция, а только её часть, широко распространён у птиц и значительно реже – у млекопитающих. В Намибии, в Национальном парке Этоша (Etosha National Park), он зафиксирован у саванных зебр (*Equus burchelli*), являющихся наиболее распространённым видом зебр в мире. Во время сезона дождей эти зебры обитают на западной стороне центрального сектора парка, а во время сухих и полусухих сезонов, когда многие источники пересыхают, большинство (около 70 %) мигрирует в восточную часть этого сектора. Всё логично: когда источники воды высыхают в западной части, животные устремляются туда, где вода есть, – в восточную часть. Однако не всё так просто, поскольку миграционное поведение животных является балансом между затрачиваемой энергией и получаемой выгодой. И в этом смысле питьевой фактор действительно является доминирующим. Мигрирующая зебра хотя и должна преодолеть большое расстояние во время миграции, после её завершения может проходить в день намного меньше, чем немигрирующая, вынужденная искать новые (не высохшие) водные источники. Таким образом, в среднем мигрирующая зебра (с учетом миграции и возвращения) пройдёт вдвое меньше, чем немигрирующая.

Важно понимать, что в иерархических животных сообществах чаще всего мигрирующими являются подчинённые особи, не способные выжить в конкурентной борьбе за ограниченные ресурсы. Однако в нашем случае мигрирующими являются именно доминантные особи⁽¹⁾. При этом нападение хищников, по-видимому, не

¹ Иерархия среди зебр выражена слабо, поэтому для понимания этого явления исследуется положение зебр в стаде, для чего часть из них снабжается радиоошейниками с GPS. Полученные данные свидетельствуют, что немигрирующие зебры во время сезона дождей занимают более бедную пищу территорию вдоль границы

является определяющим фактором, поскольку риск быть съеденным во время миграции противопоставляется риску быть съеденным у дальнего водоёма, к которому, в отсутствие альтернативы, стремится большая часть животных.

В чём же тогда дело? Важную роль в этом процессе, вероятно, играет сибирская язва, вспышки которой наиболее характерны для сезона дождей. В частности, почти половина годовой смертности приходится на последние два месяца сезона дождей. После его окончания большая часть стада мигрирует, оставляя слабых, подчинённых, особей на эндемичной территории, где они заражаются и умирают (хотя и не все). Более того, поскольку путь до восточной части длится около трёх недель, а заражённые особи умирают в среднем за неделю, миграция позволяет предотвратить эпидемию. При этом стоит оговориться, что передачи возбудителя воздушно-капельным путём не происходит: после смерти животного бактерии из его трупa попадают в почву, откуда с травой поступают в желудочно-кишечный тракт новой жертвы. И поскольку животные перемещаются, вероятность того, что пища будет обсеменена возбудителем, стремится к нулю (важно помнить, что во время болезни возбудитель попадает в почву с различными выделениями, такими как слюна, моча и кал).

С наступлением сезона дождей в игру вступает фактор пищевого поведения. Дело в том, что зебры предпочитают открытые луга, которых на западе больше. Ценность их в сухой сезон ниже из-за увядания травы, но с наступлением сезона дождей стадо устремляется назад, чтобы насладиться обновлённой сочной травой на большом пространстве лугов, при том, что численность немигрирующих особей успела значительно поредеть под действием сибирской язвы, а значит, и конкуренция за пищевые ресурсы снизилась.

Сложно сказать, существовала бы частичная миграция в отсутствие сибирской язвы, но следует констатировать, что она органично «встроилась» в сложный эволюционный процесс регулировки численности.

западной части центрального сектора (см. Zidon R., Garti S., et al. *Zebra migration strategies and anthrax in Etosha National Park, Namibia*. *Ecosphere*. 2017; 8(8):e01925; DOI: 10.1002/ecs2.1925).

Ранее мы уже говорили, что наибольшая смертность от сибирской язвы у зебр регистрируется во время сезона дождей, что наиболее вероятно связано с потреблением обсеменённой возбудителем пищи, то есть имеет место алиментарный путь распространения инфекции. Более того, крупные вспышки заболевания приходятся на годы с большим количеством осадков. Исследования¹ показывают, что во время сезона дождей зебры потребляют с пищей значительно больше земли, чем в сухие сезоны, поэтому вероятность попадания возбудителя выше. Такая же модель пищевого поведения характерна для спрингбоков (*Antidorcas marsupialis*) и саванных слонов (*Loxodonta africana*), однако смертность от сибирской язвы у последних приходится не на влажные, а, наоборот, на сухие сезоны! Можно предположить, что в первую очередь это связано с тем, что в рацион слонов также входят содержащие высокий процент влаги листья деревьев, поэтому количества потребляемых с землёй спор недостаточно для развития инфекционного процесса². Соответственно, с наступлением сухого сезона в рационе слонов становится больше травы, а вода из водоёмов содержит больше возбудителя, чем во влажные сезоны ввиду сокращения её объёмов. Кроме того, жара подвергает животных стрессу, снижающему врождённую устойчивость к инфекциям, ввиду чего сравнительно низкая доза становится заражающей. Таким образом, можно видеть, что пищевое поведение конкретного вида является важным фактором, обуславливающим возможность заражения.

Вместе с тем во время влажного сезона споры возбудителя не только набухают, что облегчает их переход в вегетативную форму, также способную вызывать инфекционный процесс³, но и размы-

¹ Turner W. C., Imolohome P., et al. *Soil ingestion, nutrition and the seasonality of anthrax in herbivores of Etosha National Park*. Ecosphere. 2013; 4(1):1–19; DOI: 10.1890/ES12-00245.1.

² Хотя минимальная инфицирующая доза для большинства диких животных не установлена, известно, что летальной для куду является 15 миллионов спор при пероральном введении, для овец, лошадей и крупного рогатого скота – $1,5\text{--}5 \times 10^8$ спор, для обезьян – 4000–750000 спор, для кроликов – 10^5 спор, для собак – $1,8 \times 10^7$ спор, а для свиней – $2,7 \times 10^7$ спор. С другой стороны, при парентеральном введении летальный исход у куду обеспечивает 100–250 спор, у макак-резусов – 3000 спор, у кроликов – 5000 спор, у свиней – 10^9 спор, у овец – 75–100 спор, а у собак – 5×10^{10} спор.

³ Ранее считалось, что заражение животных вегетативной формой сибиреязвенного микроба невозможно, однако крупная вспышка, произошедшая в 2016 году в

ваются (уносятся водой) на значительные расстояния. При этом их глобальное распространение преимущественно ограничено почвами с высоким содержанием кальция и рН выше 6,1. Ещё Чарльз Хиггинс¹ в 1916 году писал², что «подходящая почва должна быть слегка щелочной». Дело в том, что при таком рН почвы поверхность влажного экзоспория споры несёт на себе отрицательный заряд, что способствует притягиванию положительно заряженных катионов и, в частности, Ca^{2+} , который через поры диффундирует к ядру и сохраняется в нём (напомним, что двухвалентный кальций необходим споре для прорастания)³. Кроме того, положительно заряженные частицы гумуса⁴, содержащие питательные элементы, как магнит, притягивают споры, закрепляющиеся на их поверхности с помощью ворсинок. В кислых почвах, напротив, на поверхности экзоспория образуется положительный заряд, который не позволяет прикрепиться к гумусу и способствует выщелачиванию кальция из ядра, что в конечном счёте приводит к гибели споры. Именно поэтому вспышки сибирской язвы как бы «привязаны» к влажным сезонам и почвам, что заметил, но не мог в своё время объяснить Казимир Давен.

Несложно догадаться, что слабощелочные почвы с высоким содержанием гумуса являются благоприятной средой для роста растений, которые будут привлекать большое количество травоядных животных. Последние, в свою очередь, в процессе питания будут поглощать частицы земли (гумуса), аккумулирующие значительное

Ямало-Ненецком автономном округе (Россия), показала возможность реализации данного механизма (см. *Опыт ликвидации вспышки сибирской язвы на Ямале в 2016 году. Под редакцией А. Ю. Поповой, А. Н. Куличенко*, Ижевск: ООО «Принт-2», 2017, 313 с.).

¹ Charles Herbert Higgins, 1875–1954; канадский и американский ветеринарный врач, патолог. Глава отделения патологии Канадского департамента сельского хозяйства (1903–1917). Автор работ по экологии *B. anthracis*.

² Higgins C. H. *Anthrax*. Health of animals branch. Bulletin No.23, Ottawa: Department of Agriculture, 1916, 8 p.

³ С другой стороны, чрезмерно высокое содержание кальция в почве может привести к повышению пористости споры и отвержению плазмид, приводящему к потере последних. Так, штаммы, извлекаемые из богатых кальцием доломитовых почв плато Гаап (Национальный парк Крюгер, ЮАР), как правило, не имеют плазмиду рХО2.

⁴ От лат. *humus* – «земля, почва»; основное органическое вещество почвы (перегноя), содержащее большое количество питательных веществ, необходимых для жизни растений.

количество спор. Далее больные животные будут искать тень у ближайших кустарников, охлаждаться в воде и умирать, «выпуская» в землю и воду значительное количество бактерий, большая часть которых образует споры, формируя так называемые *зоны хранения спор*.

При этом необходимо понимать, что данный процесс глобально не является экологически цикличным во времени, поскольку споры чаще всего сохраняются в почве десятилетиями. Так, если для уже упомянутого Национального парка Этоша ежегодные эпидемии сибирской язвы во влажные сезоны стали частью естественной экосистемы (*гиперэндемия*), то, например, для юго-западной части штата Монтана (США) эпизоотии на степных бизонах (*Bison bison bison*) не регистрировались с 1950-х годов по 2008 год. Эту же мысль подтверждает и генетика: как мы помним, геном *B. anthracis* является суперконсервативным.

Ещё одним фактором является возможность существования возбудителя в богатых питательными элементами почвах в вегетативной форме¹, о чём упоминалось ранее, однако такие формы значи-

¹ Существование этой формы возможно в виде эндосимбиоза с почвенными амёбами (например, *Acanthamoeba castellanii*), внутри которых возможно размножение, а также в ризосфере травянистых растений. Более того, в тканях сахарного тростника часто обнаруживают *B. cereus* ss и, крайне редко, *B. thuringiensis*, которые оттуда попадают в пищеварительный тракт личинок бананового стержневого сверляльщика (*Telchin licus licus*) (см. Rocha F. Y. O., Júnior A. S. N., et al. *Endophytic Bacillus bacteria living in sugarcane plant tissues and Telchin licus licus Larvae (Drury) (Lepidoptera: Castniidae): the symbiosis that may open new paths in the biological control*. Front Microbiol. 2021; 12:659965; DOI: 10.3389/fmicb.2021.659965).

Также важный вклад вносит взаимодействие с бактериофагами, вызывающими фенотипические изменения и появление псевдолизогенных вариантов, что способствует блокированию или стимулированию спорообразования, индуцированию образования биоплёнок и способности к колонизации кишечника навозных червей (*Eisenia fetida*). Отдельного внимания заслуживает бактериофаг Crookii, выделенный из крови трупного голубого гну (*Connochaetes taurinus*) в Национальном парке Крюгер (ЮАР). Он проявляет активность в отношении всех представителей *B. cereus* complex, но не к инкапсулированному сибирезвенному микробу при низких концентрациях, что даже затруднило первоначальную изоляцию возбудителя, который, как и *B. cereus* ss, не удалось выделить из образцов почвы, хотя труп животного был значительно истерзан африканскими грифами (*Gyps africanus*). Бактериофаги не способны инфицировать бактериальные споры, но они способны укрываться внутри спор после заражения вегетативной клетки и тем самым контролировать популяцию возбудителя (см. Hassim A., Lekota K. E., et al. *A unique isolation of a lytic bacteriophage infected*

тельно подвержены риску изменений (необратимой утрате патогенных свойств) и гибели. В пользу этого утверждения свидетельствует то обстоятельство, что культуры, выделенные из старых мест захоронений умерших животных (*скотомогильников*), не всегда способны синтезировать капсулу (важный фактор вирулентности) и могут быть лишены плазмид. Тем не менее на основании этого фактора было предложено¹ разделить неблагополучные по сибирской язве территории, «очаги»⁽²⁾, на типы. К **I типу** отнесены территории, расположенные на почвах, в которых отсутствуют условия для вегетации, т. е. в них возбудитель сохраняется исключительно в споровой форме. К **II типу** – территории, в которых возможно прорастание спор, но оно может прерываться из-за неблагоприятных факторов, таких как низкая температура и токсичность. К **III типу** – территории, в которых возможно прорастание и существование вегетативных форм с последующим размножением. В свою очередь эти территории делятся на те, где не происходит обогащения спорами из животных организмов (*подтип III–1*), то есть они не активны в эпизоотическом отношении (как правило, это старые скотомогильники), и те, где вегетативные формы способны попасть в живой организм и вызвать инфекционный процесс (*подтип III–2*).

Восприимчивость к инфекции животного также является важным фактором. Так, крупный рогатый скот (коровы, буйволы, быки), чьё заражение происходит в основном во время выпаса с кормом⁽³⁾ или водой, является наиболее восприимчивым, и его смертность в год доходит до сотни голов. Менее восприимчив мелкий рогатый скот (козы, овцы), а также свиньи, ослы, лошади. Далее идут дикие травоядные (зебры, олени и т. п.) и, наконец, дикие плотоядные, такие как собачьи и кошачьи. Домашние животные, а

Bacillus anthracis isolate from Pajuri, South Africa. Microorganisms. 2020; 8(6):932; DOI: 10.3390/microorganisms8060932).

¹ Яроуцк В. А., Буравцева Н. П. К вопросу об экологии возбудителя сибирской язвы, в сб. *Актуальные вопросы профилактики сибирской язвы: тезисы докладов 13 пленарной межведомственной научно-методической комиссии*. Ташкент, 1990.

² Следует отметить, что при этом речь не идёт о существовании очагов с чёткими границами, как в случае чумного микроба.

³ Чаще всего заражение происходит через искусственные корма, содержащие споры сибирезавянного микроба. В 1958 году в Германии произошла крупная вспышка среди коров из-за использования контаминированной костной муки.

также некоторые травоядные (например, кенгуру) почти не восприимчивы. Интересно, что даже среди одного вида животных имеется различие в восприимчивости. Так, молодняк оленей невосприимчив к сибирской язве и остаётся жив даже при полном вымирании всех взрослых особей (то есть естественная устойчивость снижается с возрастом).

Вместе с тем деление на восприимчивых и невосприимчивых (резистентных) весьма условно, поскольку чувствительные животные не всегда погибают, и в этой связи возможность латентного протекания инфекции также вносит определённый вклад. И хотя это явление ещё мало изучено, установлено, что споры могут спокойно циркулировать в кровотоке серых крыс (*Rattus norvegicus*) до 30 дней. Более того, в штатах Огайо, Индиана и Иллинойс (США) возбудитель был обнаружен в лимфатических узлах здоровых свиней, отправленных на убой через девять месяцев после эпидемии. Вполне вероятно, что при определённых обстоятельствах (например, воздействие стресса) споры могут прорасти и привести к фульминантному течению инфекции. Кроме того, изменение климатических условий также влияет на восприимчивость. Так, домашние куры и лягушки резистентны к действию сибиреязвенного микроба, однако если первых подвергнуть действию холодом (длительно охлаждать водой), а вторых, наоборот, нагреть, инфекционный процесс не только разовьётся, но и приведёт к летальному исходу!

Нельзя забывать и о деятельности хищников, поскольку больное, ослабленное животное становится для них лёгкой добычей. Особенно существенным этот фактор становится, когда речь идёт о стае хищников, загоняющих и раздирающих свою жертву: кровь, содержащая возбудитель, сочится из жертвы на землю, пока она жива и уходит от погони, а затем из кусков мяса, уносимых хищником, который к тому же может его ещё и закопать в землю, где вегетативные клетки спорулируются и сохраняются. Однако даже если больное животное и не стало жертвой хищников, оно способно заразить собратьев через слюну, если этим животным свойственно нюхать и лизать больного собрата, то есть возможна реализация *контактного механизма* распространения инфекции.

Нельзя исключать и реализацию *трансмиссивного механизма*, то есть вклад кровососущих двукрылых насекомых (мух, слепней, комаров), о возможности участия в распространении сибирской язвы которых первым сообщил Уильям Баудд¹ ещё в 1863 году² (за десятилетие до выделения возбудителя Робертом Кохом!). И хотя его предположение было доказано экспериментально с участием жигалок (*Stomoxys calcitrans*) только в 1912 году^{3,4}, конкретные механизмы к настоящему времени полностью не изучены (очевидно только, что возбудитель поглощается кровососущим преимущественно в самой вирулентной форме – капсульной⁵). При всей концептуальной очевидности всё ещё не установлено, происходит ли заражение через обсеменённую ротовую полость, или с фекалиями, или реализуются оба варианта. Однако, например, у слепней *Tabanus rubidus* бактерии обнаруживаются в ротовой полости только неделю, тогда как в фекалиях – до 18 дней (то есть до самой смерти), из чего можно предположить возможность реализации обоих вариантов. Неясно и какая доля кровососущих, пойманная на определённом расстоянии, будет способна к заражению, а также как на этот процесс влияет эффективность их питания. Эксперименты⁶ показывают, что если указанных слепней, частично напившихся заражённой кровью, всего на 10 секунд перенести на 14 здоровых лошадей, 12 из них заразятся, а 11 умрут. При этом летальный исход в случае двух последних лошадей обеспечит всего один слепень. С другой стороны, если слепням дать полностью напиться заражённой кровью и после 48-часовой выдержки (стандартный интервал между кормлением) перенести на 6 здоро-

¹ William Budd; 1811–1880; британский (английский) врач. Автор работ по брюшному тифу, дезинфектологии и гигиене.

² Budd W. *Observations on the occurrence of malignant pustule in England illustrated by numerous fatal cases.* Association Medical Journal. 1863; 1(85):110,159,237.

³ Schuberg A., Kuhn M. *Ueber die Uebertragung von Krankheiten durch einheimische stechende insekten.* Arb. a. d. kais. Gesundheitsamte. 1912; 40(2):209–234.

⁴ Примечательно, что это же предположение сформировалось и в народном сознании. Так, например, на западе штата Техас (США) скотоводы называют некоторых мух «charbon», поскольку они ответственны за распространение сибирской язвы у скота, особенно после влажной весны!

⁵ Вместе с тем нельзя исключать и поглощение спор, поскольку последние выделялись от кровососущих мух в случае *Bcbva*.

⁶ Kraneveld F. C., Djaenodin M. *Test on the dissemination of anthrax by Tabanus rubidus, in horses and buffalo.* Overgedukt uir de Nederlandsindische Bladen Voor Diergeneeskunde. 1940; 52:339–380.

вых лошадей, заразятся только 2 лошади, при этом для обеспечения летального исхода понадобится не менее 40 слепней. Все эти опыты подтверждают гипотезу¹, высказанную в 1935 году Николаём Григорьевичем Олсуфьевым² (с соавт.): успех кормления отдельных кровососущих двукрылых насекомых влияет на последующий риск, поскольку те особи, что успешно насытились, будут откладывать последующее кормление и поэтому представляют меньший риск, хотя и могут стать причиной отдалённых вторичных случаев заражения; те же особи, чьё насыщение было прервано, будут сразу искать новые объекты пищи, передавая им инфекцию, поэтому они представляют высокий риск.

Тут же нужно добавить, что дождливый сезон является благоприятным для кровососущих двукрылых насекомых, поскольку он обеспечивает, во-первых, успешное вылупление из яиц (и последующие окукливание личинок в случае мух), а во-вторых, «концентрирование» возбудителя в зонах хранения и, как следствие, животных с высокой концентрацией бактерий в крови. Таким образом, один фактор значительно повышает вклад другого, «сдвигая» время эпизоотии уже на сухой, как правило, летний сезон, что наиболее характерно для северных регионов.

После смерти больного животного возможен вклад «похоронного ритуала», который, строго говоря, имеется только у слонов, однако нечто схожее присуще и другим животным. Так, лесной (*Bison bison athabascae*) и степной бизоны могут собираться вокруг мёртвого собрата, подталкивать его и тыкать носом, пытаясь поднять. При этом нужно оговориться, что в «закрытых» тушах возбудитель существует исключительно в вегетативной форме (высокое содержание CO₂ и низкое O₂), а задержка выхода крови наружу приведёт к гибели бактериальных клеток уже на 4-й день^{3,4}. В этой связи «свое-

¹ Olsufev N. G., Leler P. P. *On the importance of tabanids in the spread of anthrax*, in *Parasites Transmitters anim. venimanx. Rec. Trav. 25th Anniv. Sci. Pavlovsky 1909–1934* (Applied Entomology, 1936; 24:177–179).

² 1905–1988; украинский и советский энтомолог, паразитолог и эпидемиолог. Член-корреспондент АМН СССР (1957). Один из организаторов исследования туляремии в СССР, а также крупный исследователь слепней.

³ Экстравазация (т. е. распространение в окружающие ткани) крови, часто описываемая в литературе, на практике происходит крайне редко.

временная» деятельность падальщиков (птиц и насекомых) является ещё одним фактором, способствующим споруляции, а также распространению возбудителя. Особую роль в этом процессе играют падальные мухи (каллифориды), которые питаются биологическими жидкостями трупа и после насыщения перелетают на близлежащую растительность, где отрывают излишки пищи и испражняются, загрязняя листву. Установлено¹, что в непосредственной близости от трупа мухи *Chrysomya albiceps* и *Chrysomya marginalis* откладывают в среднем по 19 капель на листья, располагающиеся на высоте от 1 до 3 метров от земли. При этом некоторые животные, например, куду, белохвостые олени и козлы, любят питаться именно такими гофрированными листьями, то есть снова имеет место фактор пищевого поведения. Нельзя забывать о вкладе некоторых кровососущих, например, слепней, которые не брезгают лакомиться и свежими трупами.

Подводя итоги сказанному, можно видеть, что сохранению и распространению сибиреязвенного микроба способствует его взаимодействие со множеством взаимосвязанных факторов, среди которых важную роль играют пищевое поведение животного-носителя, сезонность, характеристика почв, наличие хищников, «похоронных ритуалов», падальщиков и переносчиков (преимущественно мух)². К этим факторам ещё можно добавить вакцинацию, отсутствие которой является, пожалуй, главным фактором³, температуру (напомним: споруляция возможна в диапазоне от 12 до 45 °С), солнечный свет и наличие ветра, разносящего споры, однако

⁴ Важно помнить, что при подозрении на сибирскую язву животное **запрещено** вскрывать (в отсутствие должных условий). Для анализа будет достаточно кусочка уха и мазка биологической жидкости, которая исходит от трупа.

¹ Braack L. E., de Vos V. *Feeding habits and flight range of blow-flies (Chrysomya spp.) in relation to anthrax transmission in the Kruger National Park, South Africa*. Onderstepoort Journal of Veterinary Research. 1990; 57:141–142.

² Иногда сибиреязвенный микроб обнаруживается у клещей, хотя их вклад, вероятно, малозначим. У комаров сибиреязвенный микроб обнаружен не был, однако экспериментально была продемонстрирована возможность передачи инфекции морским свинкам с участием комара жёлтолихорадочного (*Aedes aegypti*) и комара *Aedes taeniorhynchus* в течение 4 часов, при этом эффективность составила 12 % (см. Turell M. J., Knudson G. B. *Mechanical transmission of Bacillus anthracis by stable flies (Stomoxys calcitrans) and mosquitoes (Aedes aegypti and Aedes taeniorhynchus)*. Infection and Immunology. 1987; 55:1859–1861).

³ Подробнее о ней поговорим в Главе 19.

вероятность воздушного заражения крайне мала, а также механизмов «решения о споруляции» и «решения о прорастании», о которых говорилось в Главе 2. Всё многообразие взаимодействия этих факторов в совокупности способствовало закреплению возбудителя на обширных территориях, в результате чего в среднем ежегодно регистрируется от 20 до 100 тысяч случаев сибирской язвы, в основном в бедных сельских районах, причём не только у животных, но и у людей, потребляющих контаминированные продукты (*алиментарный путь*), работающих без средств индивидуальной защиты с инфицированными животными (*контактный механизм*) и их шкурами (*воздушно-пылевой путь*), реже при укусах насекомых (*трансмиссивный механизм*) и загрязнении ран землёй (*контактный механизм*). Нельзя забывать и про заражения в результате техногенных катастроф и биотерроризма (*аэрогенный механизм*), о которых поговорим позже.

6

ЯМАЛЬСКАЯ ВСПЫШКА

Ямало-Ненецкий автономный округ (Россия). 16 июля 2016 года¹ в Единую диспетчерскую службу Ямальского района поступает информация от оленеводов бригады № 13 муниципального оленеводческого предприятия «Ярсалинское» о падёже одомашненной популяции северных оленей (*Rangifer tarandus*) у местных оленеводов, находящихся на стоянке в 20 км от бригады. Выехавшие на место специалисты Салехардского центра ветеринарии установили, что с 7 по 16 июля падёж составил 60 голов, причём если в первые дни погибло от 1 до 3 животных, то уже 15 и 16 числа – около 20, а увеличение падёжа совпало с касланием (перегоном).

Первое животное погибло в районе устья реки Неросавейяха (район озера Письёто), однако факт отравления исключается, по-

¹ Опыт ликвидации вспышки сибирской язвы на Ямале в 2016 году. Под редакцией А. Ю. Поповой, А. Н. Куличенко, Ижевск: ООО «Принт-2», 2017, 313 с.

скольку на территории отсутствуют промышленные предприятия. Сообщается, что на фоне аномально жаркого лета (выше 35 °С) животные становились вялыми, отбивались от стада и падали. При осмотре обнаруживалось выраженное трупное окоченение, выделение белой (иногда розово-красной) пены из носа и рта. Поверхностных повреждений, язв, эрозий на слизистых оболочках не выявлено. Животные упитанные. Все павшие олени относятся к годовалым самкам (50 %), молодняку (40 %) и кастратам (10 %).

Патологоанатомическое исследование двух трупов показало расширение и полнокровие всех сосудов головного мозга, его гиперемия (т. е. переполнение кровью питающих сосудов), отёк (в том числе отёк мозговых оболочек), частичные кровоизлияния. В лёгких обнаружена застойная гиперемия и отёк, сердце расширено, а в грудной клетке и перикарде – большое содержание жидкости соломенного и розового цвета. Данная патологоанатомическая картина свидетельствует о развитии лёгочной и сердечной недостаточности. Предварительный диагноз: гипертермия (перегрев / смерть от теплового удара) и отравление продуктами горения тундры. Секционный материал передан для исследования в Тюменскую областную ветеринарную лабораторию.

18 июля в Управление по делам коренных малочисленных народов Ямальского района поступает информация от бригады № 17 о падёже оленей в стадах местных оленеводов, находящихся на стоянке в 15 км севернее фактории Тарко-Сале, куда днём ранее выезжали пастухи бригады (расстояние между стоянками 9 км). Выехавшие на следующий день специалисты установили падёж примерно 10 оленей. При этом у предыдущих оленеводов масштаб эпизоотии вырос до 30 голов в сутки (также погибло 4 оленегонные собаки). Кроме того, за два дня до прибытия специалистов у бригады № 17 также умер один олень.

24 июля Тюменская областная ветеринарная лаборатория сообщает о подозрении на наличие в секционном материале возбудителя сибирской язвы, ввиду чего образцы дополнительно передаются во Всероссийский научно-исследовательский институт вете-

ринарной вирусологии и микробиологии, и уже к 25 июня диагноз «сибирская язва» подтверждается (штамм группы V.Br.001/002¹).

3 августа зафиксирована гибель одного оленя в Тазовском районе (положителен на *B. anthracis*), в результате чего вводится карантин на территории трёх очагов²: (1) объединённая территория в районе озёр Письёто, Большое Ядванто, Малое Ядванто и Тэтато (и 9 обнаруженных там захоронений); (2) территория в районе посёлка Новый Порт и (3) территория в Тазовском районе. Очаги расположены друг от друга на расстоянии до 250 км и отделены водными преградами – Обской губой и Тазовской губой.

Всего за период вспышки сибирской язвой заболело 2650 оленей, из которых 2350 умерло, а 300 подверглось вынужденному забою³. В качестве причин официально выделено два фактора: *прекращение вакцинации и погодные условия*.

Дело в том, что вакцинация, начатая ещё в 1940-е годы, привела к ликвидации сибирской язвы в этом регионе, а проведённое в начале нового тысячелетия исследование более 200 тысяч образцов почвы к 2007 году не выявило присутствия *B. anthracis*, ввиду чего вакцинация оленей была прекращена. Хочется верить, что решению о прекращении вакцинации также способствовали наблюдения⁴ Бениями́на Ла́заревича Черка́сского⁵, который, исследуя в

¹ Все штаммы, выделенные во время этой вспышки, отнесены к группе V.Br.001/002 кластер SIBERIA (см. Куличенко А. Н., Еременко Е. И. и др. *Биологические свойства и молекулярно-генетическая характеристика штаммов Bacillus anthracis, выделенных во время вспышки сибирской язвы в Ямало-Ненецком автономном округе в 2016 г.* Проблемы особо опасных инфекций. 2017; 1:94–99; DOI: 10.21055/0370–1069–2017–1–94–99; Pisarenko S. V., Eremenko E. I., et al. *Phylogenetic analysis of Bacillus anthracis strains from Western Siberia reveals a new genetic cluster in the global population of the species.* BMC Genomics. 2019; 20:692; DOI: 10.1186/s12864–019–6060-z; Eremenko E., Pechkovskii G. et al. *Phylogenetics of Bacillus anthracis isolates from Russia and bordering countries.* Infection, Genetics and Evolution. 2021; 92:104890; DOI: 10.1016/j.meegid.2021.104890).

² Распоряжение губернатора Ямало-Ненецкого автономного округа от 11.11.2016 № 334-Р.

³ В районе озера Письёто заболело 1500 оленей (из 8000), из которых 1200 пало; в районе озера Большое Ядванто заболело/пало 200 оленей (из 10 000); в районе озера Малое Ядванто пало 200 оленей (из 8000); в районе озера Тэтато пало 350 оленей (из 6000); в посёлке Нижний Порт пало 349 оленей (из 9000); в районе нефтегазоконденсатного месторождения «Пякяхинское» Тазовского района обнаружен один павший олень.

⁴ Черкасский Б. А. *Путешествие эпидемиолога во времени и в пространстве*, Воронеж: ФГУП ИПФ «Воронеж», 2003, 640 с.

1968 году 360 образцов почвы с эндемичной территории на полуострове Ямал, установил, что почва свободна от сибиреязвенного микроба¹, бедна органикой (содержание гумуса менее 3 %), и её pH находится в диапазоне от 3 до 5 (напомним: для выживания спор необходим pH > 6).

Что касается погодных условий, то установлено, что в период с 7 по 21 июля среднесуточная температура воздуха не опускалась ниже 25 °С (минимальная температура была не ниже 18 °С, максимальная – около 29 °С), а суммарное количество осадков составило 15,1 кг/м³, причём 77 % выпало 13 июня, а остальное – 26 июня. Это самые высокие температуры воздуха и самое низкое количество осадков, зарегистрированные в летние месяцы с 1990 года. Всё это способствовало тому, что впервые за долгое время к 15 июля почва прогрелась на глубине 10 см до 20 °С, на глубине 40 см – до 12 °С, а на глубине 100 см – до 5 °С. Дальнейший прогрев почвы продолжался неделю, увеличив приведённые показатели на 2–5 °С при влажности менее 30 %.

Если обратиться к метеорологическим наблюдениям² (Рис. 6.1 и Рис. 6.2), то можно видеть, что в последнее десятилетие отмечается чередование холодных и тёплых годов с незначительным изменением среднегодовой температуры воздуха, поэтому вклад именно аномально жаркого лета 2016 года, по всей видимости, незначителен. Однако в районе Обской губы (где и произошла вспышка 2016 года), расположенной на границе прерывистой и сплошной областей вечной (многолетней) мерзлоты³, это чередование стало причиной значительного увеличения высоты снежного покрова,

¹ 1934–2007; советский и российский врач, эпидемиолог. Академик РАН (1999). Заслуженный деятель науки РФ (2002). Автор работ по теоретической эпидемиологии, в частности разработал фундаментальную социально-экологическую концепцию эпидемиологического процесса и учение о предпосылках и предвестниках осложнения эпидемиологической ситуации.

² С этого периода округ официально объявлен «территорией СССР, свободной от сибирской язвы».

³ Ezhova E., Orlov D., et al. *Climatic factors influencing the anthrax outbreak of 2016 in Siberia, Russia*. *Ecohealth*. 2021; 18(2):217–228; DOI: 10.1007/s10393–021–01549–5.

³ Это территория площадью 35 млн км², характеризующаяся отсутствием перидического протаивания. Часть криолитозоны, то есть верхнего слоя земной коры, характеризующегося отрицательной температурой горных пород и почв. Вечная

Мистерии сибирской язвы

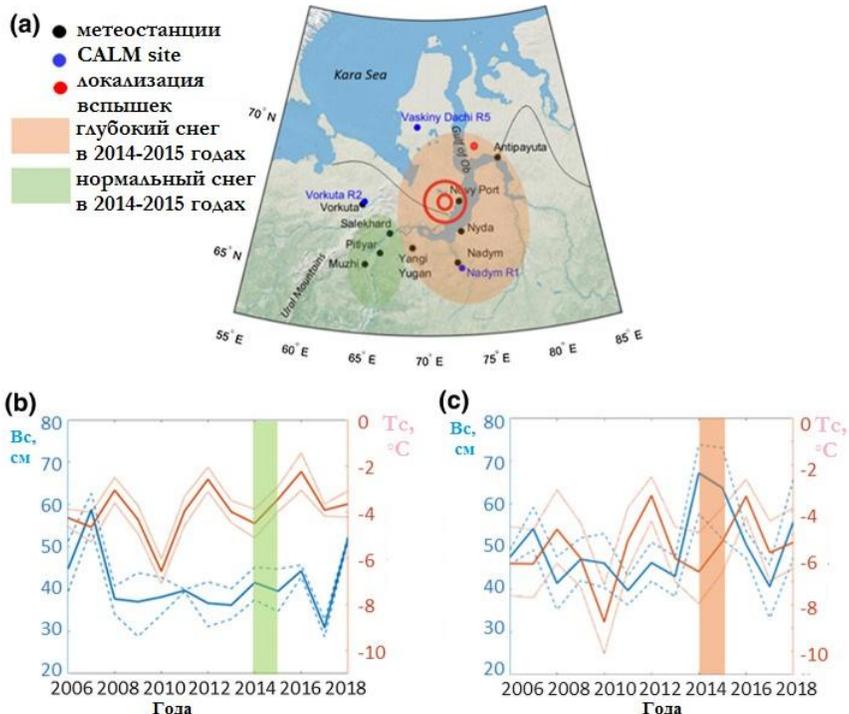


Рис. 6.1. Метеорологические наблюдения, основанные на данных метеостанций и мониторинга почв вечной мерзлоты (CALM site). Карта эпизоотической активности в 2016 году (a), где чёрные кривые отмечают границу сплошной (севернее) и прерывистой областей вечной мерзлоты, а красные круги показывают области крупных эпизоотий. На графиках отмечена медианная высота снежного покрова (Bs; синим) и средней годовой температуры (Ts; красным) на участках к востоку от Уральских гор (b) и вблизи Обской губы (c), где в 2014–2015 годах отмечен рост снежного покрова (по Ezhova E., 2021)

максимум которого зарегистрирован в 2014–2015 годах. Снежный покров, действуя как изолятор, препятствует передаче тепла от поверхности почвы холодному воздуху: то есть чем больше снежный покров, тем больше накопленного за тёплый сезон тепла сохранит почва и, соответственно, тем меньше её промерзание зимой. Эта мысль согласуется с данными наблюдений (Рис. 6.2-а), по которым толщина активного (деятельного) слоя грунта (ALT), то есть

мерзлота может простираться на глубину более 1000 метров и оставаться замороженной в течение тысяч лет.

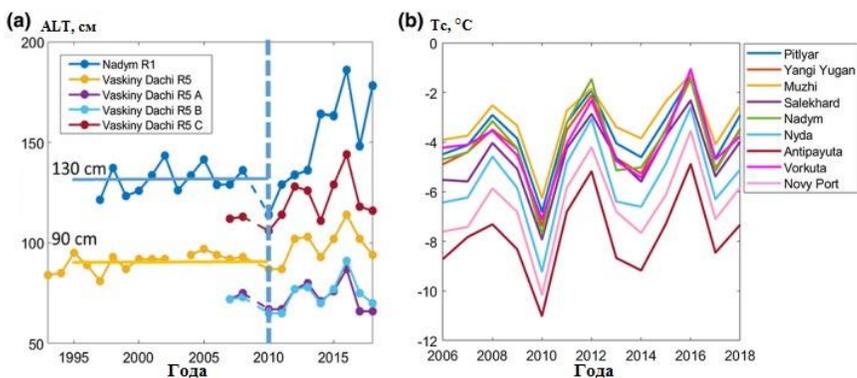


Рис. 6.2. Толщина активного (деятельного) слоя грунта (ALT) в зависимости от времени по данным мониторинга почв вечной мерзлоты (а) и среднегодовой температуры воздуха (б). Измерения с 2009 по 2010 год недостоверны и отмечены пунктиром. Относительное увеличение ALT составило 43 % в районах прерывистой мерзлоты (Надым) и 26 % в районах сплошной вечной мерзлоты (Васькины дачи). Обратите внимание, что динамика изменения ALT в районах вечной мерзлоты соответствует динамике изменений среднегодовой температуры воздуха (по Ezhova E., 2021)

того слоя, который подвергается ежегодному оттаиванию на территориях вечной мерзлоты, увеличилась в районах прерывистой и сплошной областей вечной мерзлоты на 43 и 26 % соответственно. Таким образом, имело место постепенное оттаивание вечной мерзлоты как минимум с 2014 года (если не с 2011 года, как можно видеть из графика).

С другой стороны, как и отмечалось выше, в районе Нового Порта (Рис. 6.1-а) имеется тенденция к уменьшению количества летних осадков, тогда как в Ныде, расположенной на другом берегу Обской губы, наоборот, количество осадков ежегодно увеличивается, что, вероятно, связано с потеплением и усилением озеленения. Так, в июле 2016 года в Новом Порту действительно выпало лишь 5 % от климатической нормы. Дело в том, что постепенное отступление морского льда на фоне глобального потепления неизбежно приводит к плавному увеличению осадков и, как следствие, увеличению снежных покровов в зимний период (меньшему промерзанию почвы) и озеленению в летний. И поскольку Новый Порт располагается севернее, эти процессы там не так активны, как в Ныде,

куда летом и уходит циклон. В этой ситуации растения, которым не хватает влаги летом, вытягивают воду корнями из более глубоких слоёв почвы, что способствует выносу спор сибирской язвы, которые, вероятнее всего, сокрыты в глубинах вечной мерзлоты¹, на поверхность, где их с сухой травой потребляют олени. Далее при низкой дозе споры спокойно проходят через желудочно-кишечный тракт животного (либо инфекция протекает в латентной форме) и с калом снова оказываются в почве⁽²⁾. При этом если олени в поисках пищи перемещаются южнее, то споры могут попасть в почвы, подходящие для выживания, поскольку усиление озеленения способствует их обогащению гумусом и, как следствие, изменению рН на более благоприятный для возбудителя, из-за чего возможно не только его сохранение, но и накапливание. Таким образом, следует заключить, что реальная экология *B. anthracis* значительно сложнее того, что было описано в предыдущей главе⁽³⁾, а глобальное изменение климата также является важным фактором, вносящим свой вклад в сохранение и распространение возбудителя. Поэтому наиболее надёжным способом предотвращения эпизоотий на сегодняшний день является вакцинопрофилактика восприимчивых контингентов⁴, поскольку даже многолетнее отсутствие эпизоотии и кажущиеся неподходящими для выживания возбудителя условия, как показали события 2016 года, не являются гарантией защиты от вспышек сибирской язвы.

¹ К настоящему времени всё ещё неизвестно, в каком виде существует возбудитель, однако предполагается, что он может сохраняться не только в виде спор в почве, но и в виде вегетативных клеток в трупах замороженных животных.

² Незначительное количество спор обычно транзитно проходит через желудочно-кишечный тракт животного, не вызывая инфекцию, однако в случае наличия повреждений слизистой оболочки (язвы и т. п.) споры способны «закрепиться» и размножиться до количества, необходимого для развития инфекции (т. е. минимальной инфицирующей дозы), что было показано в опыте по заражению свиней после кормления битым стеклом (неопубликованные данные).

³ Обратите внимание, что, несмотря на существующую устойчивость молодняка оленей к возбудителю, во время этой вспышки именно они составили большую часть павших животных.

⁴ Временной разброс между вспышкой заболевания и датой прекращения вакцинации может объясняться как снижением популяционного иммунитета, так и накоплением возбудителя до минимальной инфицирующей дозы.

Из предыдущих глав мы знаем, что сибиреязвенный микроб попадает в восприимчивый организм через потребление с пищей (*алиментарный путь*), контакт с инфицированным животным (*контактный механизм*), вдыхание (*аэрогенный механизм*) и реже через укусы кровососущих двукрылых (*трансмиссивный механизм*) и повреждённые кожные покровы, в основном при загрязнении их контактированной землёй (*контактный механизм*). Если говорить о человеке, то заражение также возможно при работе с инфицированными шкурами (*воздушно-пылевой путь*). Таким образом, *входными воротами* инфекции могут быть ротовая полость, желудочно-кишечный тракт, лёгкие и кожа, но где бы ни оказался сибиреязвенный микроб, он столкнётся с важной составляющей врождённого гуморального иммунного ответа, именуемой *система комплемента*, активации которой по альтернативному пути будет противостоять поверхностный белок BclA – та самая «ворсинка» на поверхности споры. Во-первых, BclA связывается с фактором комплемента H, препятствуя тем самым связыванию фрагмента C3b с поверхностью споры и, как следствие, ингибируя нисходящую активацию системы комплемента.

Напомним, что альтернативный путь активации системы комплемента реализуется в результате спонтанного гидролиза белка C3 в плазме крови на фрагменты C3b и C3a, и последующего связывания C3b с поверхностью бактериальной клетки (споры). Далее C3b связывается с C3-конвертазой, в результате чего образуется C5-конвертаза, которая разрезает белок C5, чьи фрагменты привлекают фагоциты в очаг инфекции, а также запускает формирование мембраноатакующего комплекса, формирующего поры в мембране бактериальной клетки. При этом, чтобы исключить активацию комплемента на собственные клетки организма, в системе присутствуют регуляторы, в числе которых уже упомянутый фактор комплемента H, связывающий C3b и, соответственно, не дающий ему связаться с C3-конвертазой, что и останавливает нисходящую активацию. Именно эту стратегию и избрал сибиреязвенный микроб. Кроме того, BclA связывается с сывороточным плазмино-

геном, что придаёт споре способность расщеплять всё тот же фрагмент СЗb, если он смог-таки достичь её поверхности, и таким образом останавливать нисходящую активацию. Далее спора, в ответ на снижение кислорода и наличие питательных веществ, прорастает в вегетативную клетку¹ (только в случае лёгких этот процесс протекает медленнее), и тогда уже синтезированная капсула будет обеспечивать уклонение от системы комплемента.

На первой стадии инфекционного процесса, именуемой продромальной, вегетативная клетка сталкивается с первой линией защиты организма, в качестве которой выступают *катионные антимикробные пептиды*, секретируемые эпителиальными клетками кожи, дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта, а также нейтрофилами и НК-клетками. Целью пептидов является клеточная стенка, взаимодействие с которой приводит к гибели бактерии, поэтому последние эволюционно выработали множество стратегий сопротивления, среди которых электростатическое отталкивание пептидов, эффлюксные насосы, а также синтез белков, разрушающих или экранирующих пептиды. Сибиреязвенный микроб использует только две стратегии. Во-первых, он повышает положительный заряд клеточной стенки за счёт синтеза лизилфосфатидилглицеринов и аланилирования тхоевых кислот (последнее обеспечивается системой этерификации D-аланина, кодируемой опероном *dltABCD*), ввиду чего положительно заряженные пептиды отталкиваются от одноимённо заряженной клеточной поверхности. Во-вторых, он синтезирует протеазы, например, протеазу против человеческого катионного антимикробного пептида LL-37, широко секретируемого организмом, особенно в ранах, на поверхности дыхательных путей и слизистых оболочек. Экспериментально было показано², что сибиреязвенный микроб обладает самым высоким уровнем устойчивости к этому пептиду среди своих ближайших родственников. Так, 50%-ная ингибирующая рост концентрация LL-37 для *B. anthracis* составляет 40–60 мкг/мл, тогда как для

¹ Ранее считалось, что споры уносятся фагоцитами в дренирующие лимфатические узлы и прорастают уже в них, поэтому эти сведения всё ещё можно встретить в научной литературе.

² Thwaite J. E., Hibbs S., et al. *Proteolytic degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by Bacillus anthracis may contribute to virulence*. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50(7):2316–2322; DOI: 10.1128/AAC.01488–05.

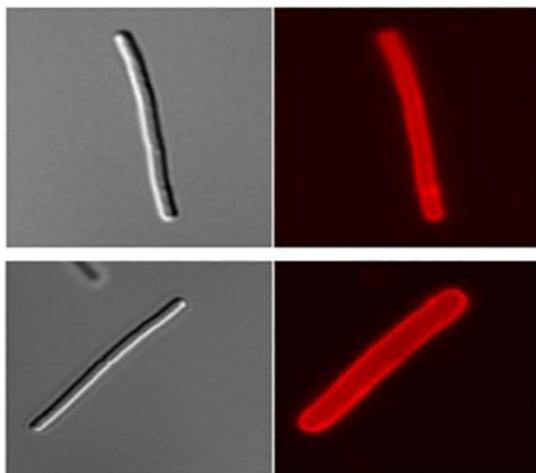


Рис. 7.1. *Vegetативные клетки B. anthracis, синтезирующие (нижний ряд) и не синтезирующие (верхний ряд) капсулу, после инкубации с 5 мкг НВД-3; ув. 1000х, дифференциальная интерференционно-контрастная (слева) и флуоресцентная (справа) микроскопия. Можно видеть, что хотя НВД-3 и связался с клеточной стенкой в обоих случаях, часть его была «задержана» капсулой (по O'Brien D. K., 2022)*

B. thuringiensis – 37 мкг/мл, для *B. cereus* – 33 мкг/мл.

Кроме того, в ответ на факторы окружающей среды (температуру млекопитающего, повышение концентрации углекислого газа и бикарбоната) активируется ген *atxA*, опосредованно запускаящий синтез отрицательно заряженной капсулы, которая связывает пептиды за счёт разномённости зарядов. Особенно эффективно связывание в отношении челове-

ческих дефензинов, за исключением β -дефензина 3 (НВД-3), который хотя и задерживается капсулой, всё же способен «добраться» до клеточной стенки и вызвать гибель бактерии (Рис. 7.1).

Помимо капсулообразования, как мы помним из Главы 3 (если нет, то перечитайте её), *atxA* запускает синтез протективного антигена (РА), а также летального фактора (LF) и отёчного фактора (EF). Первый связывается со специфическими рецепторами клеток (ANTXR и другими) и расщепляется на фрагменты РА20 и РА63, после чего фрагмент РА63 образует комплексы с летальным и отёчными факторами, образуя, соответственно, летальный токсин (LF + РА) и отёчный токсин (EF + РА). Затем токсины диффундируют в кровь и быстро разносятся по организму, попадая в межклеточное пространство, где нарушают сигнальные взаимодействия между клетками, а также проникают в клетки. При этом важно понимать, что специфические рецепторы имеются почти на всех

клетках восприимчивых организмов, поэтому токсины проникают во многие клетки, включая иммунные. Внутри клетки комплекс токсина (LF + PA и EF + PA) распадается, высвобождая летальный и отёчный факторы, которые оказывают на них следующие воздействия: летальный фактор расщепляет митоген-активируемые киназы клетки, что нарушает сигнальные пути, а отёчный фактор увеличивает синтез циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), что в случае иммунных клеток приводит к синтезу IL-6 и ингибированию TNF- α , а также к ингибированию окислительного взрыва, то есть этапа фагоцитоза, при котором возбудитель подвергается воздействию активных форм кислорода.

Среди всех иммунных клеток первыми к месту инфекции обычно прибывают нейтрофилы, но чаще всего они связаны только с кожной инвазией и редко привлекаются в случае лёгочного заражения (исключение тут составляют только собаки и свиньи). Нейтрофилы активно захватывают споры и вегетативные клетки, несмотря на их размер (Рис. 7.2). Захваченные споры, как правило, спокойно прорастают внутри нейтрофила, после чего уже вегетативные клетки подвергаются действию α -дефензинов, поскольку активным формам кислорода успешно противостоит отёчный фактор. В результате уже через 3 часа погибает до 30 % захваченных бактерий, а через 4 часа – 70 %. При этом в случае штаммов, содержащих только одну плазмиду, к четвёртому часу уничтожается более 90 % бактерий, продуцирующих только токсин (рХО1+рХО2-), и 80 % бактерий, продуцирующих только капсулу (рХО1-рХО2+). Что это означает? Инфекция оказывается локализованной в месте очага, поэтому кожные инвазии у человека чаще всего протекают без системного распространения, а собаки и свиньи оказываются мало восприимчивыми к лёгочным инфекциям и выживают даже при ингалировании высоких доз возбудителя, поскольку в их лёгкие прибывает достаточное количество нейтрофилов.

С макрофагами всё несколько сложнее. Дело в том, что BclA, защищающий споры от активации системы комплемента по альтернативному пути, способен связываться с субъединицей C1q белка C1, активируя классический путь системы без участия антител (напомним, что в норме активация происходит при взаимодействии C1q с антителом), что приводит к поглощению спор макро-

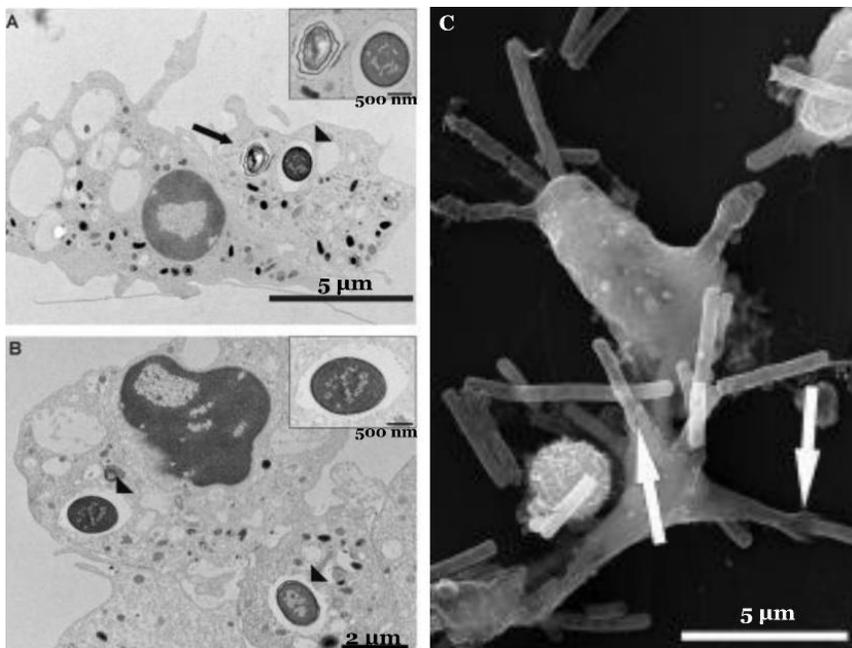


Рис. 7.2. Споры (наконечник стрелки) и вегетативные клетки (стрелка) *B. anthracis*, захваченные человеческими нейтрофилами через 90 мин (А) и 180 мин (В), а также в момент поглощения (С). Увеличенные вставки на А и В приведены для наглядности; просвечивающая (А, В) и сканирующая (С) электронная микроскопия (по Mayer-Scholl A., 2005). Обратите внимание, что нейтрофилы позволяют спорам прорасти, ввиду чего в В их почти нет, а также, что они способны поглотить вегетативные клетки, несмотря на их размер!

фагами. Дальнейшее пребывание бактерии в макрофаге (даже в случае поглощения вегетативной клетки) приводит к активации инфламмосомы¹ NLRP1, что запускает внутри макрофага воспалительный сигнальный каскад, приводящий к программируемой клеточной гибели, именуемой *пироптозом*, при которой внутри макрофага синтезируются ИЛ-1β и ИЛ-18, а каспаза-1 нарушает целостность плазматической мембраны, в результате чего в клетку устремляются ионы и вода, что приводит к её набуханию, лизису и, соответственно, высвобождению значительного количества синтезированных ИЛ-1β и ИЛ-18. Этот защитный механизм врождённого

¹ Мультибелковый олигомерный комплекс, отвечающий за секрецию ИЛ-1β и ИЛ-18; от англ. inflammation – «воспаление».

иммунитета организма необходим для ограничения внутриклеточного размножения патогена. И действительно, летальный фактор сибиреязвенного микроба, расцепляя N-конец белков инфламмосомы NLRP1, тем самым активирует её, однако в случае человека этого не происходит, поскольку те белки, на которые нацелен летальный фактор, у человеческой инфламмосомы NLRP1 отсутствуют. И это играет злую шутку, поскольку если у животных пироптоз макрофагов позволяет привлечь дополнительные нейтрофилы и «сконцентрировать» инфекцию⁽¹⁾, то в случае человека сибиреязвенный микроб захватывается макрофагами² и, как в такси, уносится ими к последнему барьеру на пути системного распространения – дренирующим место инвазии лимфатическим узлам. В фаголизосоме макрофага, как ранее считалось, он, окружённый капсулой, противостоит негативному воздействию среды и благодаря действию отёчного фактора и антролизина O⁽³⁾ подавляет фагоцитоз. Особенно хорошо это работает в случае спор, захваченных в лёгких альвеолярными макрофагами, ведь, как уже говорилось в Главе 2, экзоспорий содержит аргиназу, снижающую концентрацию оксида азота в макрофагах (напомним: из-за конкуренции с синтазой оксида азота за L-аргинин), а при прорастании синтезируется белок CotR, структурно похожий на фосфолипазы, также препятствующие фагоцитозу. Однако реальность, как выясняется^{<4>}, обстоит иначе: только 20 % спор и вегетативных клеток смогут пере-

¹ Следует оговориться, что этот механизм хорошо работает только в случае штаммов, на поверхности спор которых синтезирована антроза. В случае же антроза-отрицательных штаммов (ant-) имеет место задержка в споропрорастании, поэтому макрофаг захватывает и уносит в лимфатический узел споры, которая легко переживает фагоцитоз, прорастая уже вне макрофага. И даже в том случае, если спора прорастёт внутри макрофага, антроза-отрицательные штаммы синтезируют меньше летального и отёчного фактора (по сравнению с ant+), которых оказывается недостаточно для активации инфламмосомы NLRP1 и, следовательно, запуска пироптоза.

² Как правило, путём активации TLR2 и MyD88.

³ Токсин из семейства холестерин-зависимых цитолизинов, который способен сформировать пору в мембране, взаимодействуя с содержащимися в ней холестеринном. Механизм его действия до конца не ясен, однако установлено, что он обладает литической активностью против фагоцитов (см. Mosser E. M., Rest R. F. *The Bacillus anthracis cholesterol-dependent cytolyisin, Anthrolysin O, kills human neutrophils, monocytes and macrophages*. BMC Microbiol. 2006; 6:56; DOI: 10.1186/1471-2180-6-56).

⁴ Hu H., Sa Q., et al. *Inactivation of Bacillus anthracis spores in murine primary macrophages*. Cell Microbiol. 2006; 8(10):1634-1642; DOI: 10.1111/j.1462-5822.2006.00738.x.

жить макрофагальный фагоцитоз. Дело в том, что хотя возбудитель действительно быстро проникает в фаголизосому (и в случае спор быстро прорастает), вегетативные клетки не показывают признаков удлинения или деления, в результате чего гибнут, однако механизмы этого процесса пока ещё не изучены.

Интересно, что взаимодействие спор с макрофагами приводит к стимулированию выработки IL-1 α , IL-1 β , IL-6 и TNF- α ⁽¹⁾, а внутриклеточное действие отёчного фактора не только снижает концентрацию активного кислорода, но и воздействует на гены клеточной миграции, запуская механизмы очистки, которые заставляют макрофаги мигрировать в лимфатические узлы (Рис. 7.3). Какой вклад вносит этот механизм в распространение инфекции, до конца не ясно, поскольку макрофагальный фагоцитоз у человека завершённый, однако в случае животных он может вносить определённый вклад в доставку бактерий ввиду их высвобождения после пироптоза.

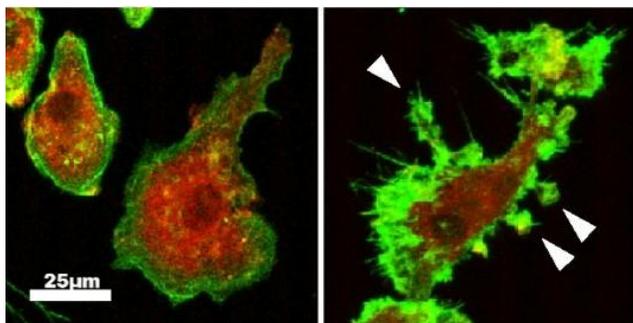


Рис. 7.3. Филоподиальные выступы (белые стрелки) и перераспределение актина (зелёный) по границе клетки после воздействия отёчного фактора на макрофаг (справа), что указывает на его готовность к движению, в сравнении с макрофагами, не подвергшимися воздействию (слева); 24-часовое культивирование макрофагов, полученных из костного мозга мыши (модель), иммунофлуоресцентное окрашивание (по Kim C., 2008; Copyright (2008) National Academy of Science, USA, публикуется с разрешения правообладателя)

Таким образом, мы, с одной стороны, имеем весьма слабый механизм «захвата» лимфатического узла в случае человека, а с другой – достоверные сведения, что сибиреязвенный микроб способен

¹ CpG-последовательность ДНК *B. anthracis*, распознаваясь TLR-9, также стимулирует выработку TNF- α (см. Jeon J. H., Kim Y. H., et al. *Bacillus anthracis* genomic DNA enhances lethal toxin-induced cytotoxicity through TNF- α production. BMC Microbiol. 2014; 14:300; DOI: 10.1186/s12866-014-0300-9).

вызвать воспалительную реакцию в лимфатическом узле (лимфаденит), прорвать этот барьер¹ (Рис. 7.4) и проникнуть в лимфатическую систему (геморрагический лимфаденит), а оттуда – уже в системный кровоток (бактериемия). Конечно, какая-то часть бактериальных клеток переживает фагоцитоз, но её явно будет недостаточно для «прорыва» лимфатического узла и уж тем более системного распространения. И вот тут начинается самое интересное. Дело в том, что дендритные клетки мало устойчивы к действию *B. anthracis*, но способны достаточно быстро добраться до лимфатического узла, а в случае лёгочной инвазии ещё и легко пересекают тонкий слой эндотелиальных клеток, доставляя бактерии напрямую в кровеносную систему. Именно поэтому они являются тем «тройным конём», который открывает бактерии путь к системному распространению². Кроме того, споры из лёгких по лимфатическим сосудам мигрируют в лимфатические узлы средостения, которые расположены в центральной части грудной клетки между лёгкими и в чьи функции входит обеспечение отвода лимфы из лёгких (Рис. 7.5). Также, вероятно, бактерии в лимфатические узлы средостения могут попадать из селезёночного резервуара.

С этого момента наступает системный этап инфекционного процесса, при котором бактерии стремительно размножаются в крови, достигая концентрации 10^9 бактерий/мл, разносясь по целевым тканям и органам, которые, как правило, сильно васкуляризованы: сердце, лёгкие, лёгочная паренхима, головной мозг, селезёнка, печень, почки и кишечник. Интересно, что в лёгких под действием кислорода бактерии формируют споры, которые прилипают к альвеолярному эпителию (поэтому они не выделяются с дыханием во внешнюю среду), а некоторые даже обнаруживаются внутри эпителиальных клеток³. Сохранение в лёгких настолько эф-

¹ Интересно, что наибольшее повреждение наносят не бактериальные клетки, а вызванная в ответ на них острая воспалительная реакция, приводящая к появлению 297 уникальных белков, из которых только 83 являются общими с лимфой (см. Porova T. G., Espina V., et al. *Whole proteome analysis of mouse lymph nodes in cutaneous anthrax*. PLoS One. 2014; 9(10):e110873; DOI: 10.1371/journal.pone.0110873)

² Сравните эту стратегию с той, которую использует чумной микроб (Глава 13 Оперы о чуме).

³ Проникновение осуществляется за счёт связывания BclA с интегрином $\alpha 2\beta 1$ поверхности эпителиальной клетки через лиганд, в качестве которого выступает фак-

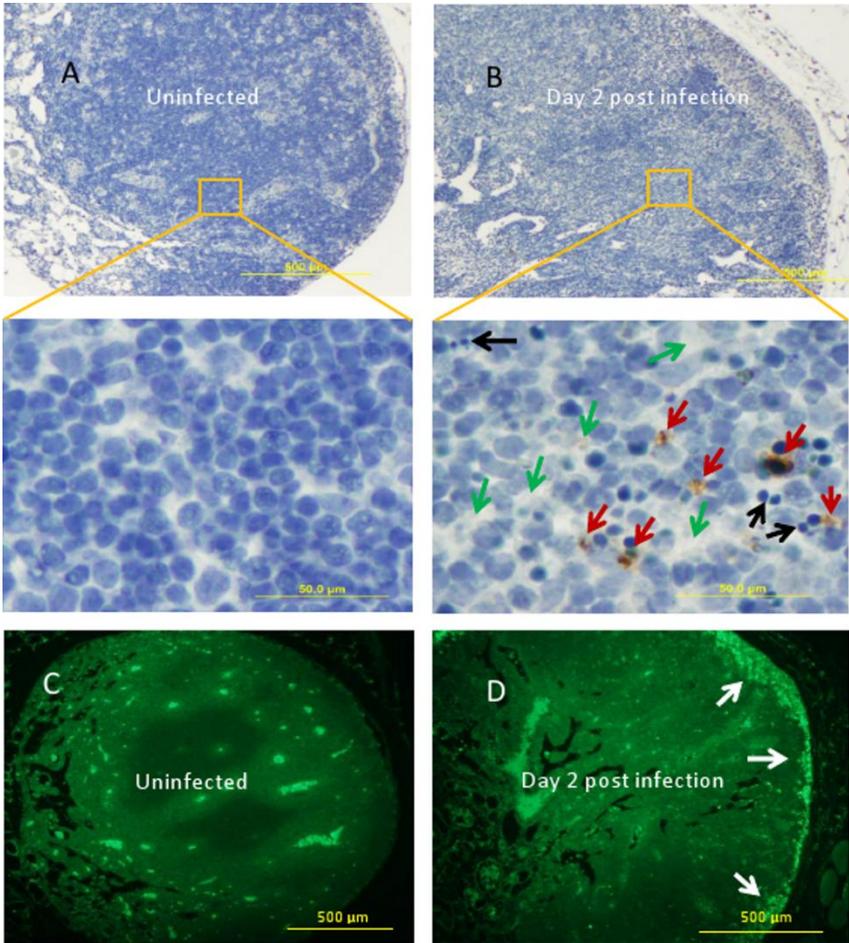


Рис. 7.4. Патологические изменения в кортикальной области лимфатического узла на 2-й день инфицирования *B. anthracis* (справа) по сравнению с неинфицированным лимфатическим узлом (слева); мышинная модель, окраска гематоксилин-эозином (A и B), иммунофлуоресцентное окрашивание (C и D). Обратите внимание (фрагмент B) на выраженный отёк ткани (зелёные стрелки), многочисленные пикнотические клетки (красные стрелки) и инфильтрующие нейтрофилы (чёрные стрелки), а также (D) на бактериальное скопление (белые стрелки) в субкапсулярной области (по Порова Т. Г., 2014)

тор системы комплемента C1q (см. Xue Q., Gu C., et al. *Entry of Bacillus anthracis spores into epithelial cells is mediated by the spore surface protein BclA, integrin α2β1 and complement component C1q*. Cell Microbiol. 2011; 13(4):620–634; DOI: 10.1111/j.1462–5822.2010.01558.x). Это указывает на то, что и система комплемента подавляется не полностью.

фективное, что жизнеспособные споры сибиреязвенного микроба можно обнаружить в бронхоальвеолярном лаваже даже на 4-й неделе! А некоторые спящие споры можно обнаружить даже в фагоцитах лёгких¹ (Рис. 7.6).

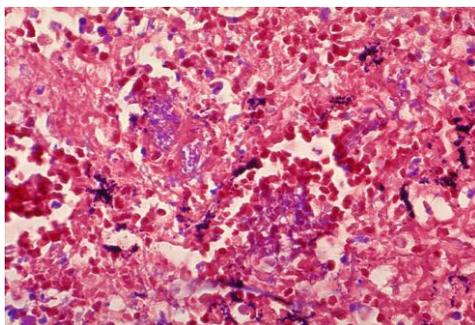


Рис. 7.5. Бактерии *B. anthracis*, обнаруживаемые в ткани лимфатического узла средостения человека, умершего от сибирской язвы; окраска по Гимзе (1976)

Важную роль на данном этапе играют токсины (летальный и отёчный факторы), выделяемые бактериями и накапливающиеся в крови (токсикоемия)². Они вызывают увеличение проницаемости сосудов, которое сопровождается цитокин-независимым сосудистым коллапсом с гипоксическим некрозом, как следствие, отёком тканей и полиорганным кровотечением (Рис. 7.7), что в конечном итоге приводит к смерти.

На поздней стадии инфекционного процесса на фоне развив-

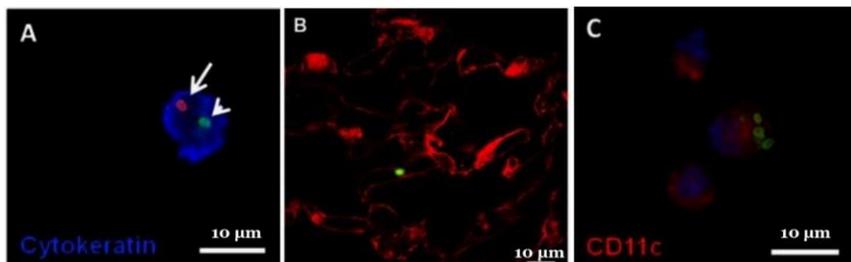


Рис. 7.6. Внеклеточные (наконечник стрелки) и внутриклеточные (А – стрелка, В – зелёный) споры *B. anthracis*, обнаруживаемые в эпителиальных клетках лёгкого (А – единичная клетка, В – срез) и макрофаге; мышинная модель, иммунофлуоресцентное окрашивание (по Jenkins S. A., 2013)

¹ Именно по этой причине при сибирской язве целесообразно проводить длительную антибиотикотерапию.

² Именно поэтому антибиотикотерапия на поздних стадиях инфекционного процесса малоэффективна.



Рис. 7.7. Отёк морды (А) и скопление крови вокруг почки (В) у гепарда (*Acinonux jubatus*), наиболее восприимчивого к действию токсинов *B. anthracis* животного среди кошачьих и псовых (по Lekota K. E., 2018)

шихся ацидоза (снижение рН до 5,3–5,5) и гипоксии, вероятно, не менее важную роль играет и ранее упомянутый антролизин О, создающий в клеточной мембране поры, в которые устремляются сукцинаты (соли янтарной кислоты), синтезируемые сибиреязвенным микробом в гипоксических условиях. Они способствуют выбросу реактивных радикалов из митохондрий, что приводит к клеточной гибели. На клеточных моделях было показано¹, что наиболее восприимчивыми к синергетическому (совместному) действию антролизина О и сукцинатов являются клетки малых дыхательных путей человека (HSAEC), эндотелия (HUVEC), кишечного эпителия (Caco-2), а также клетки печени (Hep-G2). Интересно, что высокая концентрация холестерина в крови ингибирует антролизин О и, как следствие, снижает его цитотоксичность.

Подводя итог сказанному, отметим, что при кожной форме инфекции (**Рис. 7.8**) возбудитель прорастает в вегетативные клетки в месте инвазии, откуда в отсутствие лечения мигрирует в дренирующий это место лимфатический узел, а также селезёнку и лёгкие, причём последнее может показаться несколько неожиданным для данной формы, однако объясняется тем, что размножающиеся бак-

¹ Popova T. G., Millis B., et al. Anthrolysin O and fermentation products mediate the toxicity of *Bacillus anthracis* to lung epithelial cells under microaerobic conditions. FEMS Immunol Med Microbiol. 2010; 61(1):15–27; DOI: 10.1111/j.1574–695X.2010.00740.x.

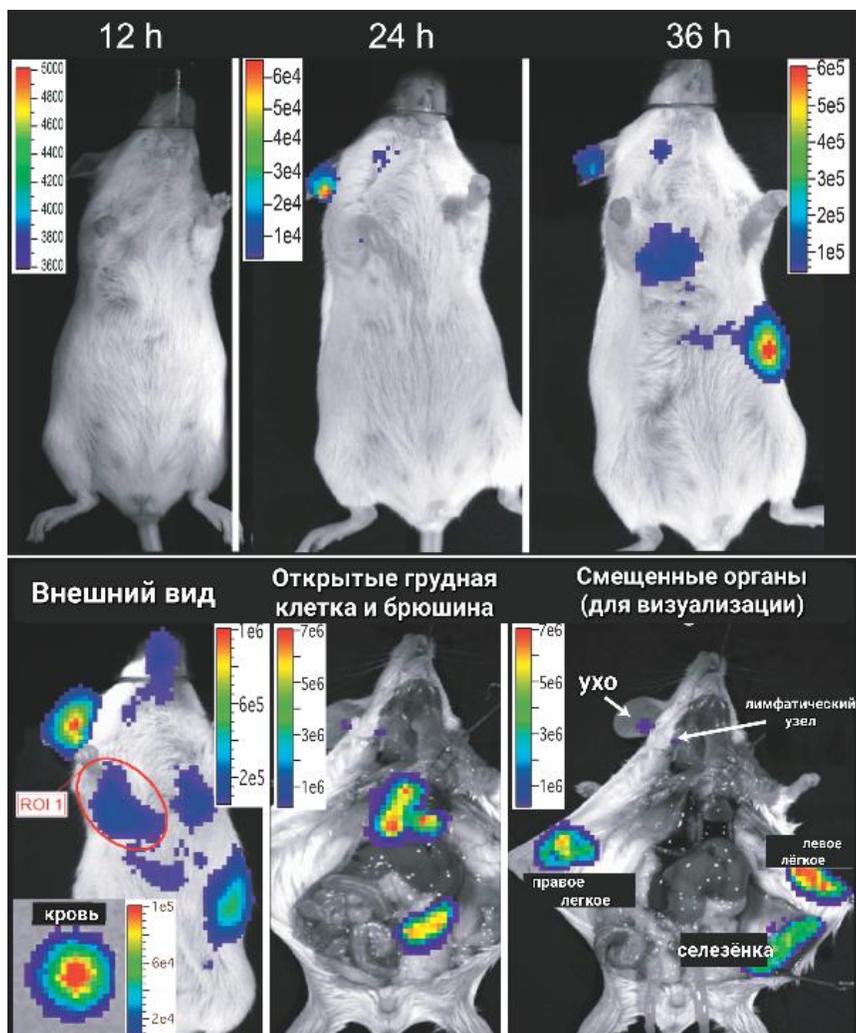


Рис. 7.8. Развитие инфекционного процесса при кожной форме сибирской язвы; мышинная модель, биолюминесцентный штамм *B. anthracis* BIG19 luxABCDE (по Glotski I. J., 2007). Можно видеть (верхний ряд), что после подкожной инфекции в правое ухо (5×10^2 спор) споры прорастают (появление биолюминесценции в ответ на метаболическую активность) в течение 120 минут, и к 24-му часу возбудитель обнаруживается в околушном лимфатическом узле, дренирующем ухо. К 36-му часу возбудитель обнаруживается в селезёнке и правом лёгком. На вскрытии (нижний ряд) возбудитель обнаруживается в ухе (3×10^3), околушном лимфатическом узле (4×10^3), селезёнке (2×10^5) и правом лёгком (2×10^4)

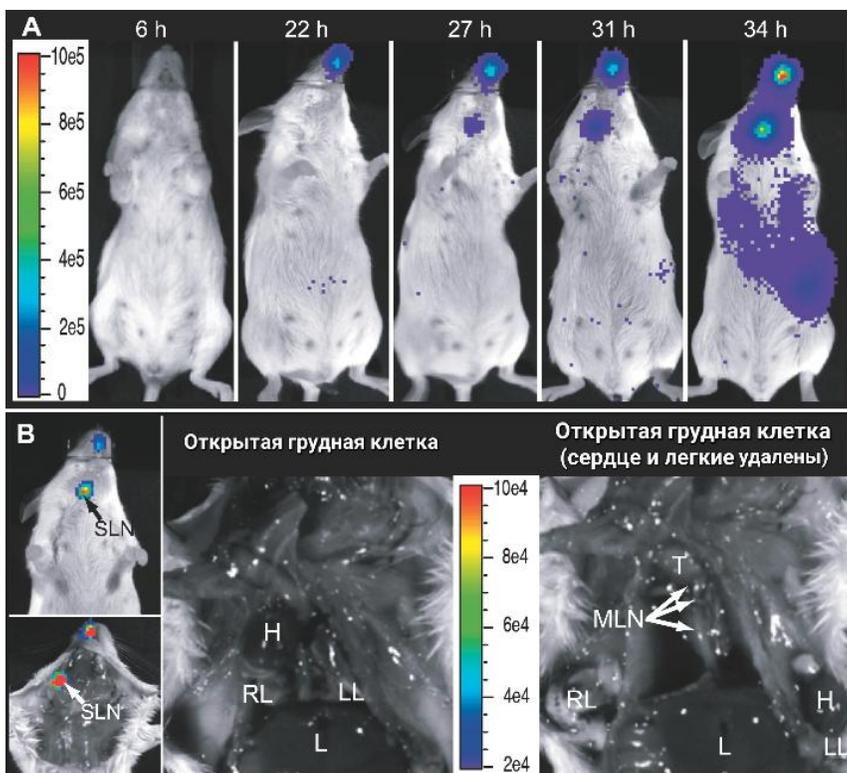


Рис. 7.9. Развитие инфекционного процесса при лёгочной форме сибирской язвы (аэрозольное заражение); мышиная модель, биологически активный штамм *B. anthracis* BIG19 luxABCDE (по Glomski I. J., 2007). Можно видеть, что (А) споры прорастают в носовой полости, откуда к 27-му часу проникают в нижнечелюстную лимфатический узел (SLN на В), но не попадают в лимфатические узлы средостения (MNL и стрелки на В). Вегетативные клетки (В) также не обнаруживаются в сердце (H), печени (L), тимусе (T), правом (RL) и левом (LL) лёгком

терии могут проникнуть в кровь и задержаться в лёгких, являющихся первым капиллярным руслом, встречающимся при возвращении крови с периферии⁽¹⁾.

¹ Следует учесть, что в лёгкие попадают «длинные», хорошо инкапсулированные бактерии. Более того, опыты показывают, что такие бактерии (в отличие от «коротких») при внутривенном введении мышам обнаруживаются в лёгких через 2 минуты и вызывают гибель за 40 минут. При этом бактерии обнаруживаются **только** в лёг-

При лѐгочной (ингаляционной) форме инфекции, в случае *аэрозольного и интраназального заражения* (Рис. 7.9 и Рис.7.10), споры попадают в носовую полость и лёгкие. Первыми прорастают споры в носовой полости, преимущественно в назально-ассоциированных лимфоидных тканях, откуда уже вегетативные клетки попадают в нижнечелюстные лимфатические узлы. Несмотря на эффективную доставку спор в лёгкие, вегетативные бактерии в лёгких и лимфатических узлах средостения не обнаруживаются. В случае *интратрахеального заражения* (Рис. 7.11) возможно развитие двух сценариев. В первом случае споры из лёгких оказываются «выброшенными» в трахею в результате мукоцилиарного клиренса¹, а также кашля, при его наличии, откуда они проникают в нижнечелюстные лимфатические узлы, в которых происходит их прорастание. Во втором случае споры прорастают в гортани, если она имеет повреждения, из которой также проникают в нижнечелюстные лимфатические узлы. Далее при всех видах заражения происходит системное распространение возбудителя.

При желудочно-кишечной форме инфекции (Рис. 7.12) споры проходят по желудочно-кишечному тракту и колонизируют слизистую тонкого кишечника, изъязвляя его стенки⁽²⁾, однако в случае наличия повреждений в верхних отделах могут прорасти и в гортаноглотке. Интересно, что в фекалиях сначала обнаруживаются вегетативные клетки, и лишь спустя время – споры, свидетельствуя в пользу того, что бактерии сначала колонизируют просвет кишечника (преимущественно тонкого) и только после этого проникают в лимфатические узлы, откуда, как и в случае кожной формы, попадают в селезѐнку и лёгкие.

ких (см. Glomski I. J., Piris-Gimenez A., et al. *Primary involvement of pharynx and peyer's patch in inhalational and intestinal anthrax*. PLoS Pathog. 2007; 3(6):e76; DOI: 10.1371/journal.ppat.0030076).

¹ Механизм защиты слизистой оболочки органов дыхания от внешних воздействий, обеспечиваемый преимущественно ворсинками реснитчатого эпителия и секреторными железами, в результате которого механические раздражители (включая патогены) эффективно удаляются во внешнюю среду.

² Можно встретить утверждение, что основным местом бактериальной инвазии являются пейеровы бляшки, однако эти данные были получены на мышинных моделях с использованием нетоксигенных штаммов (например, штамма *B. anthracis* 9602P, несущего делецию гена *pagA*, ввиду чего не способного синтезировать протективный антиген).

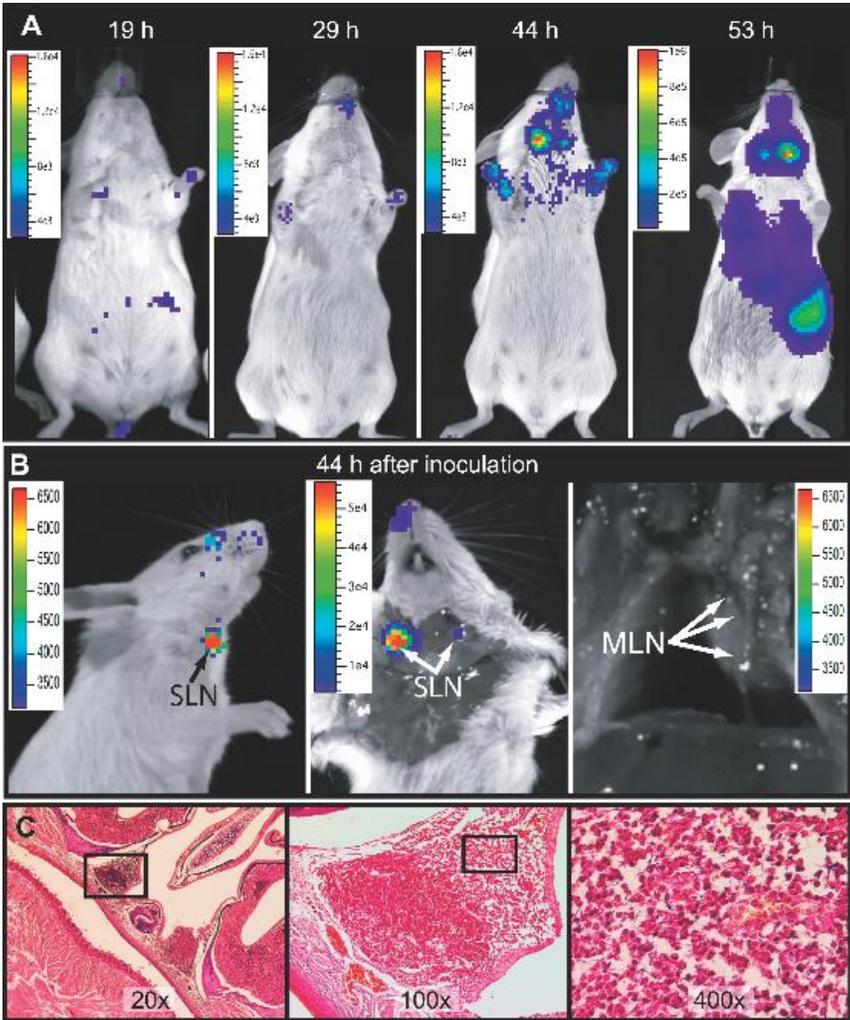


Рис. 7.10. Развитие инфекционного процесса при лёгочной форме сибирской язвы (интраназальное заражение, 1×10^5 спор); мышиная модель, биоломлюминесцентный штамм *B. anthracis* BIG19 luxABCDE, окраска по Граму (по Glomski I. J., 2007). Можно видеть, что (A) споры прорастают в носовой полости, откуда к 44-му часу проникают в нижнечелюстной лимфатический узел (SLN на B), но не попадают в лимфатические узлы средостения (MNL и стрелки на B). В назально-ассоциированной лимфоидной ткани (C) обнаруживается разрушение структуры ткани, инфильтрация многочисленными полиморфноядерными клетками, несколько областей лёгкого кровоизлияния и многочисленные бактериальные скопления, а также неповреждённый эпителиальный слой

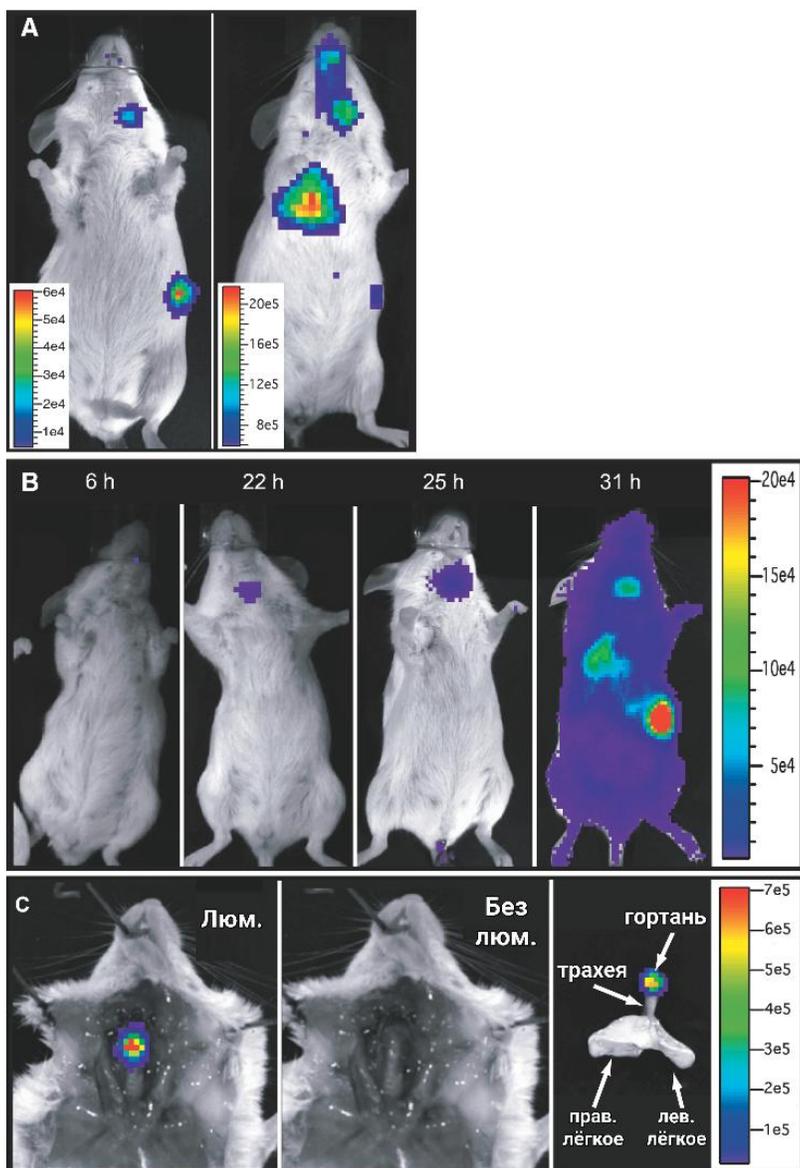


Рис. 7.11. Развитие инфекционного процесса при лёгочной форме сибирской язвы (интратрахеальное заражение); мышинная модель, биолоуминесцентный штамм *B. anthracis* BIG19 luxABCDE (по Glomski I. J., 2007). Можно видеть, что после интратрахеального введения (1×10^5 спор) возможно развитие двух сценариев: прорастание в нижнечелюстных лимфатических узлах (А, слева) и в гортани (А, справа и С), после чего происходит системное распространение возбудителя

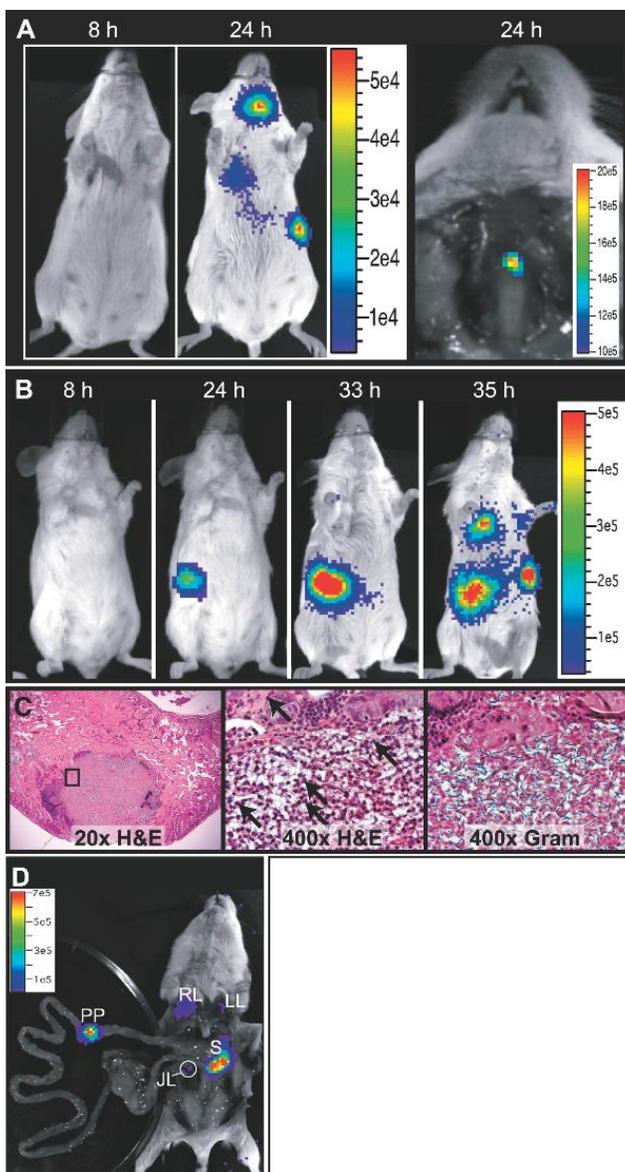


Рис. 7.12. Развитие инфекционного процесса при желудочно-кишечной форме сибирской язвы; мышинная модель, биоломинесцентный штамм *B. anthracis* BIG19 luxABCDE, окраска (слева и посередине) гематоксилин-эозином и (справа) по Граму (по Glomski I. J., 2007).

Можно видеть, что после перорального введения (1×10^8 спор) возможно развитие двух сценариев: прорастание в гортаноглотке (A) и в желудочно-кишечном тракте (B). Во втором случае через 24–33 часа споры прорастают в пейеровой бляшке (PP), в которой обнаруживаются многочисленные нейтрофилы (стрелки). Далее инфекция распространяется в лимфатические узлы тонкого кишечника (JL), селезёнку (S), а также правое (RL) и левое (LL) лёгкое

При подозрении на сибирскую язву у животных трупы вскрывать **запрещается**, поскольку доступ кислорода обеспечит спорообразование и выход спор во внешнюю среду. Вместе с тем прижизненная постановка диагноза бывает весьма затруднительной, а единственными «намёками» на сибирскую язву являются выделения кровянистой жидкости из естественных отверстий (**Рис. 7.13**), тестообразные припухлости и отёки в районе шеи¹, подчелюстного пространства (**Рис. 7.7-А**), подгрудка и живота, а также вздутие трупа и его стремительное разложение (при почти полном отсутствии трупного окоченения, которое обнаруживается только в случае северных оленей). Могут присутствовать множественные точечные кровоизлияния на конъюнктиве глаз, а также слизистых оболочках носа, ротовой полости и ануса. При отсутствии вышеуказанных признаков трупы подвергают вскрытию, обращая внимание на характерную патологоанатомическую картину, при наличии которой, как уже говорилось ранее, вскрытие **немедленно прерывают!**

Как правило, обнаруживаемая при вскрытии подкожная клетчатка пронизана мелкими кровоизлияниями, а её сосуды переполнены кровью, ввиду чего снятая шкура с внутренней стороны имеет тёмно-красный цвет (**Рис. 7.14**). Серозные покровы также испещрены мелкими кровоизлияниями. Лимфоузлы увеличены. Все паренхиматозные органы полнокровны, иногда окружены тёмной несвернувшейся кровью (**Рис. 7.7-В**). Селезёнка чаще всего сильно увеличена (спленомегалия), её пульпа размягчена (**Рис. 7.15**). Печень дряблая. В кишечнике обнаруживаются обширные кровотечения (**Рис. 7.16**), нарушения архитектуры ворсинок⁽²⁾ (**Рис. 7.17**), но лёгкие повреждены незначительно (**Рис. 7.18**). У северных оленей обнаруживаются расширение и полнокровие сосудов головного мозга, отёк мозговых оболочек и частичные кровоизлияния в мозг.

¹ Наличие опухоли в области шеи у свиней считается достаточным для подозрения на сибирскую язву.

² Интересно, что, по-видимому, воспалительная реакция в кишечнике не развивается, поскольку имеет место сокращение популяции нейтрофилов и Т-клеток в тканях тонкой кишки, сокращение популяции В-клеток в тканях толстой кишки, а также отсутствие увеличения продукции провоспалительных цитокинов.



Рис. 7.13. Кровянистые выделения из носа домашней овцы (*Ovis aries*), умершей от сибирской язвы (©State of New South Wales, Australia; публикуется с разрешения правообладателя)



Рис. 7.14. Шкура животного, умершего от сибирской язвы в заповеднике Ngorongoro Conservation Area, Танзания, июнь 2016 (фото Sabore Ole Moko, по Aminu O. R., 2020)

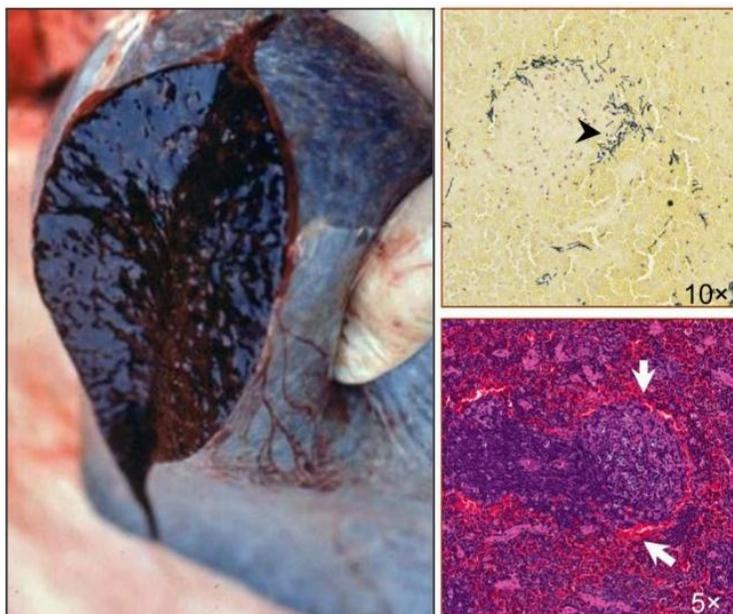


Рис. 7.15. Селезёнка (слева) и патологические изменения у животного (слева) при сибирской язве; справа сверху окраска по Брауну – Брену, снизу – гематоксилин-эозином (по Xie T., 2013). Можно видеть области кровоизлияний (белые стрелки) и бактериальные скопления (чёрные стрелки)

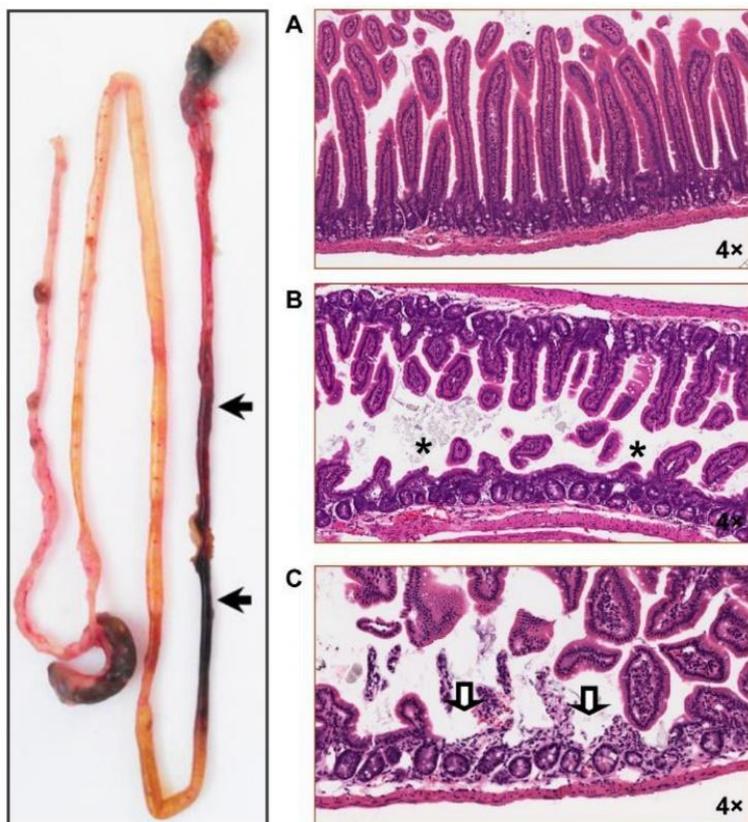


Рис. 7.16. Кишечное кровотечение (чёрные стрелки) и патологические изменения у животного, возникшие на фоне внутрижелудочного заражения вегетативными клетками *B. anthracis* ($1,3 \times 10^9$), через 2 часа (А) и 40 часов (В и С); мышьяная модель (по Хie T., 2013). Можно видеть области притупления ворсинок (звёздочка) и очаговые изъязвления (белые стрелки)

Рис. 7.17. Тонкий кишечник человека, умершего от сибирской язвы, с выраженным слизистым и подслизистым кровоизлиянием с сопутствующей артериолярной дегенерацией; ув. 96х, окраска гематоксилин-эозином (снизу)



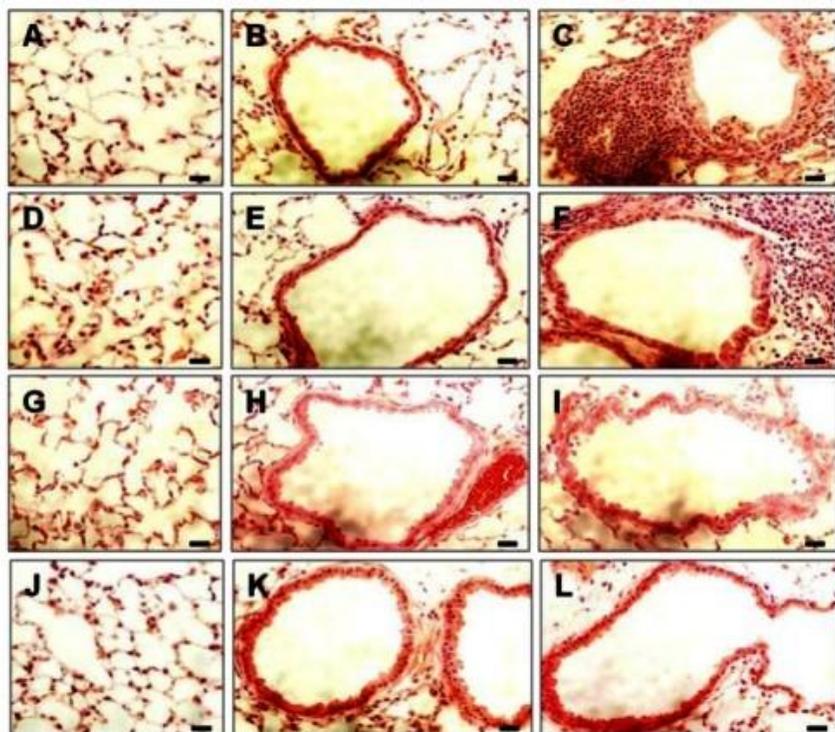


Рис. 7.18. Патологические (А-І) изменения в лёгких по сравнению с контролем (J-L) на 2-ю неделю (А-С), 4-ю неделю (D-F) и 8-ю неделю (G-I); мышинная модель, окраска гематоксилин-эозином. Можно видеть, что эпителий альвеол и мелких дыхательных путей, а также кровеносные сосуды выглядят неповреждёнными, лишь изредка обнаруживаются изолированные очаги с воспалительными инфильтратами на 2-й (С) и 4-й (F) неделях, однако на 8-й неделе лёгкие слабо отличны от контроля (по Jenkins S. A., 2013)

Для лабораторного подтверждения диагноза у не вскрытого трупа (или частично вскрытого, когда вскрытие остановлено) берут кровь из периферических сосудов, наносят толстым слоем на предметное стекло и высушивают на воздухе (без дополнительной фиксации). Место взятия предварительно тщательно обрабатывают раствором дезинфектанта, а после прижигают. Также отправляют целое ухо, для чего его (с той стороны, где лежит труп) туго перевязывают лигатурой у основания в двух местах и отрезают между ними. Не снимая лигатуры, ухо отправляют на исследование (целесо-

сообразно также сделать 4–6 мазков-отпечатков), а место отреза прижигают. В некоторых странах, если животное умерло менее суток назад, исследуют содержимое лимфатического узла (Рис. 7.19), что, конечно же, чревато заражением персонала и окружающей среды. В обратной ситуации, когда труп полностью разложился, исследуют только трубчатую кость. Трупы мелких животных (до 10 кг) отправляют в лабораторию целиком.

До получения результатов лабораторного исследования трупы оставляют на месте, не допуская до них животных и людей. В случае лабораторного подтверждения сибирской язвы трупы захоронивают в специальных скотомогильниках, о которых поговорим позже.



Рис. 7.19. Исследование содержимого лимфатического узла у гривистого барана (*Ammotragus lervia*), умершего менее 24 часов назад от геморрагического диатеза (т. е. повышенной склонности к кровоточивости) в виде сыпи на коже, указывающей на сибирскую язву; ранчо для спортивной охоты, штат Техас, США, 2001. Обратите внимание, что специалисты осуществляют столь сложную манипуляцию без средств индивидуальной защиты, что чревато выходом спор во внешнюю среду – заражением персонала и почвы

Труп человека, умершего от сибирской язвы (при наличии прижизненного лабораторного подтверждения), также **не вскрывают**, однако в случае необходимости патологоанатомическое исследование проводится врачом-патологоанатомом (без вспомогательного персонала), как правило, в присутствии специалиста по особо опасным инфекциям.

Патологоанатомическая картина в целом схожая с таковой у животных. Местами на коже могут обнаруживаться мелкие кровоизлияния (петехии) диаметром до 0,5 см, а также единичные папулы до 1,5 см, возвышающиеся над кожей и представляющие собой очаг воспаления в глубоких слоях дермы, в центральной части которого можно обнаружить возбудитель (он также может быть обнаружен в сосудах, расположенных на периферии очага). Лимфатические узлы сильно увеличены (редко небольшого размера). При лёгочной форме расположенные в грудине лимфатические узлы, как правило, спаяны друг с другом и окружающей клетчаткой в единый конгломерат. Сердце сокращено, полноватое, с небольшим количеством крови. На внешней (эпикард) и внутренней (эндокард) оболочках, со стороны миокарда, возможны кровоизлияния в виде полос и пятен, тогда как сам миокард однородный и мясистый. Селезёнка может быть нормальной, больше или меньше нормы, но почти всегда дряблая. Печень нормальная, редко увеличенная, на разрезе коричневато-желтоватая. Повреждения почек незначительны. На слизистых оболочках почечных лоханок и мочевого пузыря могут встречаться кровоизлияния тёмно-красного цвета. Возможны кровоизлияния в мозг (об особенностях этого признака поговорим в Главе 12).

Для захоронения труп человека заворачивают в нетканый материал (плёнку) или укладывают в гроб, им выстланный, и сверху покрывают во избежание контакта трупа с внешней средой. На дно гроба насыпают сухую хлорную известь. В случае необходимости захоронения трупа без гроба его заворачивают в простыню, смоченную раствором дезинфектанта, а на дно могилы и поверх трупа насыпают сухую хлорную известь.

У животных сибирская язва характеризуется острым течением при коротком инкубационном периоде, который колеблется от нескольких часов до 8 дней, в среднем составляя 2–3 дня.

У **крупного рогатого скота** (коровы, быки, буйволы, яки и т. д.) и **диких травоядных** животных течение болезни может быть апopleксическим (молниеносным), острым, подострым и крайне редко хроническим. *Апopleксическое* течение характеризуется коротким инкубационным периодом и скорой гибелью животного. Температура обычно повышается до 42 °С, дыхание затруднено и часто прерывисто, пульс учащён. Возможно возбуждение, сопровождающееся сокращением отдельных групп мышц. Животное может бить копытами о землю и упираться головой в препятствия (стенку, забор). На смену возбуждению иногда приходит угнетение, сопровождающееся «стеклянным» взглядом, испугом, глухим мычанием. Животное может сесть, запрокидывая голову на спину или прижимая её к груди. На поздних стадиях могут появиться кровянистые выделения из носа (пена) и ануса (иногда тёмная густая кровь), а иногда из глаз и рта (**Рис. 8.1** и **Рис.8.2**). Смерть, как правило, наступает внезапно, в течение 48–72 часов. С другой стороны, известны случаи, когда животное умирает без видимых клинических признаков, а на вскрытии обнаруживается увеличенная селезёнка, переполненная бактериальными скоплениями (**Рис. 8.3**).

Острое течение болезни сопровождается повышением температуры до 41–42 °С, затруднённым дыханием, тахикардией и мышечной дрожью. На фоне снижения аппетита возможно усиление жажды. Беспокойство быстро сменяется угнетением, харак-



Рис. 8.1. Кровянистые выделения из ануса быка, умершего от сибирской язвы в Бонга (Эфиопия) в октябре 2002 года (по Olani A., 2025)

теризующимся неподвижностью взгляда и нарушением координации движений. Иногда из открытого рта свисает язык, а ноздри расширены. Развиваются отёки шеи и живота, возможны аборт, снижение выработки молока и изменение его цвета до кровянистого и тёмно-жёлтого, а также агалактия (т. е. отсутствие молока у родившей особи). Часто обнаруживаются поражения желудочно-кишечного тракта, сопровождающиеся нарушением его функции (чаще понос) и присутствием крови в кале. На слизистой оболочке ротовой полости редко можно обнаружить очаговые поражения (5–8 см), наполненные жидкостью соломенного цвета, – места первичной инвазии. В результате их самопроизвольного разрушения выделяется жидкость с примесью нитей фибрина. На поздних стадиях могут появиться кровянистые выделения из носа и рта, свидетельствующие о том, что в ближайшие дни наступит смерть.



Рис. 8.2. Кровянистые выделения из глаз и рта (слева), а также влагилица и ануса (справа) у 2-летней беременной коровы (*Bos taurus*), умершей от сибирской язвы, вызванной штаммом *B. anthracis* BF-5 (B.Br.CNEVA), Южная Бавария (Германия), август 2021. Интересно, что геном этого штамма почти идентичен штамму BF-1, вызвавшему вспышку сибирской язвы в этой местности в 2009 году (по Braun P., 2021)

Некоторыми специалистами выделяется *подострое* течение, которое имеет ту же клиническую картину, но растянутую во времени, и может сопровождаться несколькими эпизодами ослабления («выздоровления»). Смерть, как правило, наступает через неделю.

Хроническое течение болезни встречается крайне редко и характеризуется незначительным подъёмом температуры, прогрессирующим истощением на фоне поноса, а также припухлостью и отёками в подкожной области, которые чаще наблюдаются в области груди, плеча, грудной клетки, промежности и боков. Продолжительность болезни от 2 до 3 месяцев, при этом смерть чаще всего наступает в результате убоя поголовья после лабораторно диагностированной сибирской язвы. При этом известны случаи, когда возбудитель возможно выделить только из подвздошных лимфатических узлов и плаценты (Рис. 8.4), ввиду чего убою подлежит всё стадо, а не отдельные особи.

Помимо подробно рассмотренных в предыдущей главе желудочно-кишечной и лёгочной форм, характеризующихся соответственно поражением кишечника и лёгких в виде отёка, выделяют также карбункулёзную (кожную) и абортивную формы. Первая характеризуется образованием карбункулов в области головы, груди, плеч и живота. Вначале они плотные, горячие и болезненные, но затем размягчаются, становятся холодными и безболезненными. Далее центральная часть карбункула некротизируется, отпадает и открывает язву. Чаще всего эта форма сопутствует острому и подо-

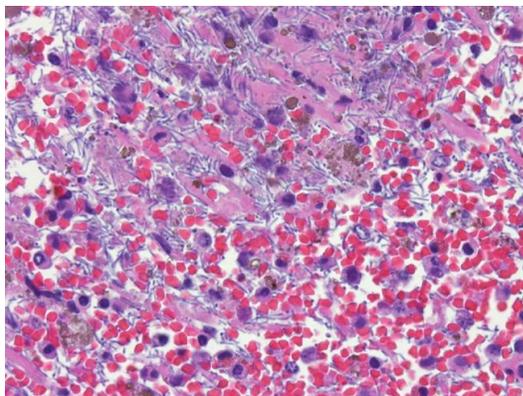


Рис. 8.3. Селезёнка 2-летней коровы (*Bos taurus*) породы Jersey, внезапно умершей без видимых клинических проявлений; ув. 600х, окраска гематоксилин-эозином. Обратите внимание на диффузное нарушение паренхимы значительными бактериальными скоплениями (Дело WSC ID 070503, 2007; публикуется с разрешения The Joint Pathology Center)

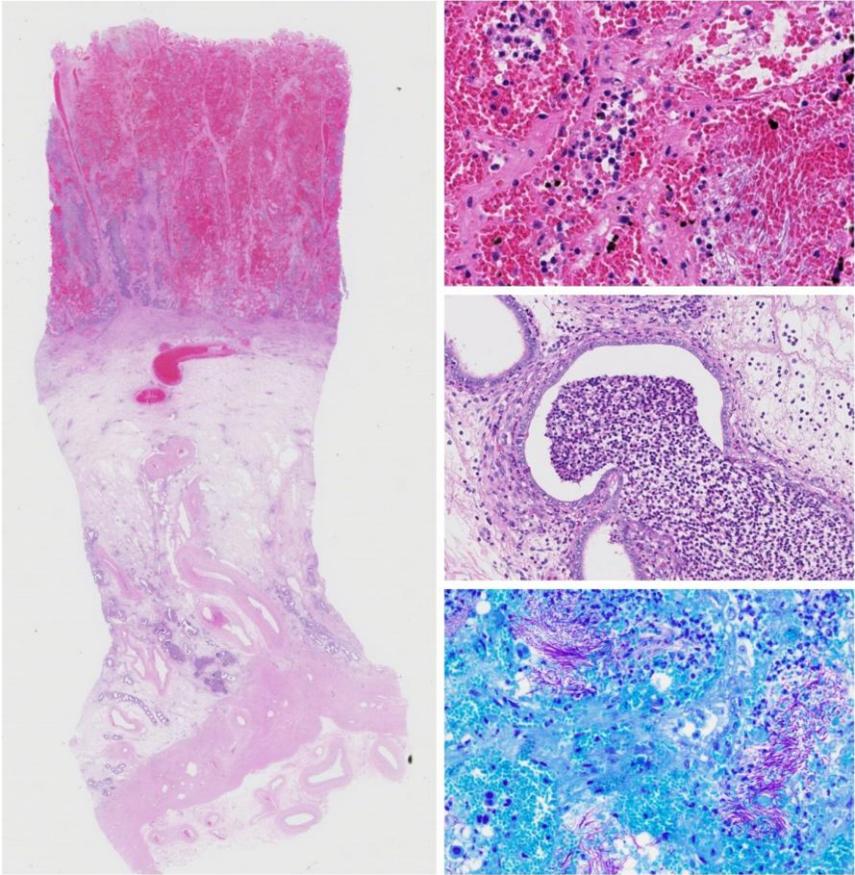


Рис. 8.4. Матка и плацента 4-летней беременной коровы (*Bos taurus*), содержащейся на молочной ферме и забитой в связи с подозрением на сибирскую язву (другие коровы на этой ферме были положительны на *B. anthracis*), кантон Юра, северо-запад Швейцарии; окраска гематоксилин-эозином (все, кроме нижнего справа) и по Гимзе (нижний справа). На изображении слева (ув. 5х) можно видеть диффузное сильное кровотечение из плаценты (сверху) с сильным отёком переходной зоны и эндометрия. На изображениях справа можно видеть обширные бактериальные скопления в зонах кровоизлияний и некрозов плаценты (ув. 327х, верхнее; ув. 200х, нижнее), а также диффузный отёк эндометрия (ув. 155х, среднее), в железах которого присутствуют многочисленные жизнеспособные и некротизированные нейтрофилы

строму течению болезни. Для abortивной формы характерны нетипичные признаки, поэтому её диагностика значительно затруднена.

Наиболее ярко и красочно сибирскую язву у вола, кастрированного самца крупного рогатого скота, описал римский поэт Публий Вергилий Марон, живший в I веке до н. э., в своей поэме «Георгики» (греч. «Земледельческие стихи»). Читаем: *«Однажды в восточных Альпах вспыхнула страшная эпидемия, которая бушевала в тёплую часть осени, не только уничтожая одно стадо овец за другим, но и убивая животных всех видов... Вот вол падает перед тяжёлым плугом. Кровь, смешанная с пеной, вырывается из его рта, когда он издаёт последний стон. Его крепкие бока увядают, тяжёлое оцепенение застилает глаза, а голова опускается к земле. Какая ему теперь польза от всех его трудов на службе человечества? Какую выгоду он получил, спяхивая тяжёлую почву плугом?..»* Конечно, поэт несколько приукрасил виденное, но как Вы думаете, какое течение болезни он описал?

Остановитесь на этом моменте. Подумайте.

Хотя мы и не можем установить достоверно ввиду небольшого количества сведений, мы можем предположить, поскольку любое оценивание столь древнего события *de facto* является лишь предположением с наибольшей вероятностью достоверности. Итак, вероятнее всего, Публий Вергилий Марон описывает апоплексическое течение, поскольку смерть вола наступила внезапно, во время работы, и, таким образом, мы можем откинуть подострое и хроническое течение, а кровавая пена, вырвавшаяся в момент смерти, позволяет исключить также и острое течение, для которого характерно разделение во времени кровотечения и смерти. Согласны ли Вы с этим?

Течение болезни у **мелкого рогатого скота** (козы, овцы и т. д.) в целом похоже на течение у крупного и подразделяется оно на такие же типы. *Апоплексическое* течение характеризуется повышением температуры, возбуждением, а также нарушением координации движений, выраженным резкими скачками. Возможны конвульсивные припадки. Достаточно быстро появляются кровянистые выделения из носа и рта (**Рис. 7.13**), после чего наступает смерть.

Для *острого* течения характерно повышение температуры и возбуждение, но несколько менее выраженное, чем при апopleксическом течении. Животные могут опрокидываться на землю и лежать в различных позах. Возможны судороги, параличи конечностей и искривление шеи. Характерной особенностью данного течения является покраснение кожи на кончике носа, на ушах и в области височных костей. Моча приобретает красный оттенок, профузный понос чередуется с запором. На поздних стадиях могут появиться кровянистые выделения из носа и рта, свидетельствующие о том, что через пару дней наступит смерть.

Подострое и *хроническое* течение протекают так же, как у крупного рогатого скота.

Сибирская язва у **лошадей** чаще всего протекает *апopleксически*. Смерть животного происходит внезапно, лошадь может просто упасть в стойле или упряжи. Незадолго до этого появляется сильная одышка, а слизистая оболочка носа и рта становится красного цвета с синеватым оттенком. Перед смертью возможны кровянистые выделения из носа, рта (пена) и ануса.

Острое течение характеризуется повышением температуры до 42,5 °С, затруднённым дыханием и коликами. Возможна мышечная дрожь. Возможны кровянистые выделения из носа и ануса (на фоне поноса). Смерть обычно наступает в течение 48–96 часов. *Подострое* течение, выделяемое некоторыми специалистами, протекает так же, но растянуто во времени.

Наиболее частой формой заболевания является карбункулёзная (кожная), возникающая в результате укуса инфицированного насекомого, что приводит к горячему и болезненному подкожному отёку в месте укуса (чаще на мошонке, вымени, животе, подгруднике), за которым следует отёк шеи, грудины и вентральной части живота.

У **ослов** и **верблюдов** болезнь протекает *остро* и *подостро*, а клинические проявления соответствуют таковым у крупного рогатого скота. У **северных оленей**, как мы помним из Главы 6, болезнь протекает *апopleксически*. Животные становятся вялыми и вскоре умирают. Важными признаками являются выраженное трупное

окоchenение, а также выделение белой (иногда розово-красной) пены из носа и рта.

У **свиней**, а также **собак, кошек и диких плотоядных** животных сибирская язва протекает местно в виде ангины (орофарингит), без распространения процесса на соседние ткани, часто приобретая *хроническое* течение, характеризующееся лишь кратковременным повышением температуры и небольшими припухлостями¹. Помните, что возбудитель может быть обнаружен в лимфатических узлах визуально здоровых свиней, отправленных на убой даже через девять месяцев после эпидемии!

Достаточно редко у свиней развивается *острое* течение болезни, сопровождающееся повышением температуры до 42 °С, угнетением, снижением аппетита, в том числе отказом от воды ввиду затруднений глотания. Животное зарывается в подстилку и подолгу лежит. Имеют место нарушения в работе желудочно-кишечного тракта (понос, запор). Может быть рвота. Смерть чаще всего наступает на 2–3-й день. В случае *фарингеальной* формы, протекающей без повышения температуры, быстро прогрессирует отёк в горле (горячий, но безболезненный), который может привести к смерти от удушья.

У супоросных маток возможны аборт или мертворождение. У здоровых поросят чаще всего развивается *лёгочная* форма из-за вдыхания инфицированной пыли с последующим развитием крупозной пневмонии и экссудативного плеврита.

Исключение из описанного выше составляют **алжирские овцы** и **карликовые свиньи**, которые эволюционно являются устойчивыми к сибирской язве, поскольку в первом случае все споры выводятся из организма за 48 часов, а во втором – остаются не прорастающими в тканях.

¹ Следует помнить, что у некоторых диких плотоядных, например, у гепарда (*Acinonyx jubatus*) возможны значительные опухолы (Рис. 7.7).

Традиция разведения китайских триониксов (*Pelodiscus sinensis*) насчитывает уже более 2400 лет, и на сегодняшний день они являются наиболее выращиваемой рептилией в Азии из-за высокой пищевой и, как считается, лечебной ценности. Существующий высокий спрос на этот товар неизбежно привёл к увеличению числа ферм (в основном в Китае и острове Тайвань) и, как следствие, снижению контроля за их содержанием, что способствовало расширению инфицирующих их патогенов.

Начиная с 2011 года регистрируются¹ смерти этих черепах от болезни, включающей такие симптомы, как плавание на поверхности воды с вывернутой шеей и жёсткими ногами, отёки на них (Рис. 9.1), а также непрерывная тряска головой на суше (*синдром тряски головой*). Кроме того, черепахи имеют сниженную бдительность по отношению к окружающей среде и потребляют меньше корма, а умирающие нередко выползают на берег и лежат, не имея возможности поддерживать равновесие тела. На вскрытии обычно наблюдаются генерализованный отёк, спленомегалия, почечные кровотечения и поражения кишечника. В органах и крови присутствуют бактериальные скопления (Рис. 9.2).

Возбудителем этой болезни является штамм *B. tropicus* JMT (о нём мы уже говорили в Главе 4), впервые² выделенный ещё в середине прошлого века как возбудитель *прибрежной лихорадки* человека и млекопитающих. Особенностью генома этого штамма является наличие генов *суа* и *ragA* (отёчный токсин) на единственной плазмиде³, а также генов, кодирующих синтез гиалуроновой кислоты и

¹ Tan A.-P., Zhao F., et al. *Isolation and identification of Bacillus cereus from Trionyx sinensis*. Guangdong Agric Sci. 2011; 20:115–119.

² Heaslip W. *Bacillus tropicus, a new species isolated from man and animals described and compared with other Bacilli resembling Bacillus anthracis*. Med J Australia. 1941; 2(19):536–543; DOI: 10.5694/j.1326-5377.1941.tb54246.xopen_in_new.

³ Интересно, что многие штаммы вида *B. tropicus* несут гены устойчивости к антибиотикам. В одном из них, штамме АОА-СРS1, используемом в биоремедиации (т. е. очистке вод, грунтов и атмосферы) из-за способности разрушать пентахлорфенол, наличие этих генов обусловлено присутствием профара vB_Btc_RBclin15

экзополисахарида (напомним, что эти же гены имеются у штаммов Vcbva (Глава 4) и штамма *B. cereus* G9241, вызывающего сибирезвенную пневмонию сварщиков), что и обуславливает клиническую картину, в частности, отёк шеи (сравните его с отёком у гепарда на Рис. 7.7). Интересно, что изначально возбудитель был идентифицирован как *B. cereus* или *B. thuringiensis* (виду высокой генетической близости к этим видам).



Рис. 9.1. Отёк на шее и конечностях (белые стрелки), а также увеличенная селезёнка (чёрные стрелки) у китайского трионикса (по Tsai J.-M., 2023)

Высказывается предположение, что, поскольку фермы, на которых разводят триониксов, обычно расположены у просёлочных дорог и окружены сельскохозяйственными угодьями, используемые на последних биопестициды, штаммы *B. thuringiensis*, могут попадать на фермы. И поскольку первоначальная идентификация штаммов JMT отнесла их к этому геномвиду, вполне вероятно, что *B. tropicus*, ошибочно принимаемый за *B. thuringiensis*, может повсеместно использоваться в сельском хозяйстве. Кроме того, плотоядные привычки черепах также вносят существенный вклад в распро-

(RBClin15), который до недавнего времени был ошибочно определён как плазмид (см. Milase R. N., Lin J., et al. *Reclassification of the first Bacillus tropicus phage calls for reclassification of other Bacillus temperate phages previously designated as plasmids.* BMC Genomics. 2024; 25:1018; DOI: 10.1186/s12864-024-10937-4).

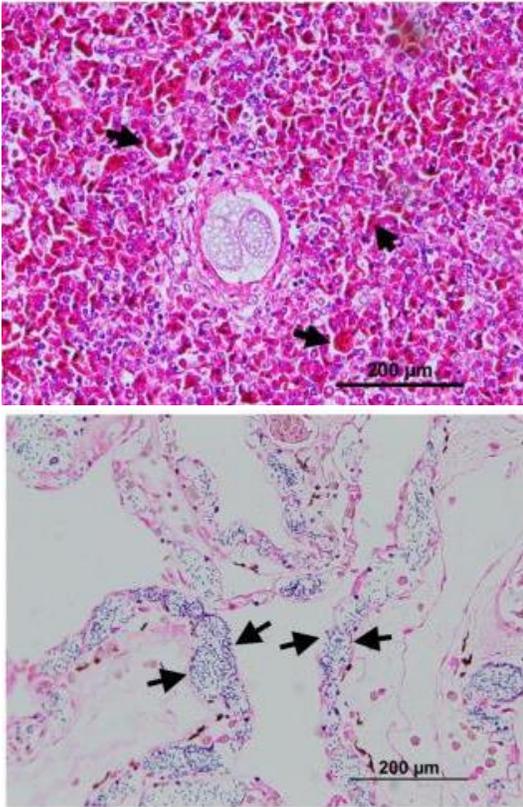


Рис. 9.2. Воспалительные клетки и бактерии (стрелки) в препаратах селезёнки (верхнее) и лёгкого (нижнее); окраска по Граму (по Tsai J.-M., 2023)

странение возбудителя, при котором его споры оказываются разнесёнными по всему водоёму фермы.

В июне 2014 года¹ от китайских триониксов с похожими симптомами был выделен штамм SYJ15, биохимически близкий к *B. cereus* ss, но генетически имеющий 1031 ген, общий для *B. subtilis*, *B. anthracis*, *B. cereus* и *B. thuringiensis*, и 816 собственных генов. Филогенетически он расположился между *B. thuringiensis* и *B. cereus* ss, и позднее с рядом других штаммов был отнесён к новому геномовиду *B. shihchuchen*. Штамм

имеет две плазмиды, однако гены сибиреязвенного токсина и капсулы расположены на большей из них. Наиболее вирулентным штаммом этого геномовида является QF108-045, выделяющийся² от черепах с 2016 года, чья плаزمида pBS01 также несёт гены сибиреязвенного токсина, поэтому высказано предложение выделять их в *B. shihchuchen* *bv. anthracis*. Кроме того, штамм QF108-045 несёт

¹ Chen J., Zhu N., et al. *First reported fatal Bacillus thuringiensis infections in Chinese softshelled turtles (Trionyx sinensis)*. 2014. *Aquaculture*; 428–429:16–20; DOI: 10.1016/j.aquaculture.2014.02.018.

² Cheng L.-W., Byadgi O. V., et al. *Pathogenicity and genomic characterization of a novel genospecies, Bacillus shihchuchen, of the Bacillus cereus group isolated from Chinese softshell Turtle (Pelodiscus sinensis)*. *Int J Mol Sci*. 2023; 24(11):9636; DOI: 10.3390/ijms24119636.

гены *hbl* и *nhe*, кодирующие гемолитический и негемолитический энтеротоксины соответственно, которые являются токсинами «диарейных» штаммов *B. cereus* ss¹!

Важной особенностью клинической картины при инфицировании этими штаммами является выраженная слабость конечностей, запрокидывание головы, носовое кровотечение, обширные кожные кровоизлияния, отёки глаз, гиперемия слизистой оболочки гортани и кишечные кровотечения (Рис. 9.3). Максимальная смертность популяции достигается обычно к шестому дню. Кроме того, штамм QF108–045 вызывает тяжёлую септицемию и проявляет устойчивость к пенициллину, амоксициллину, ампициллину, пиперациллину, тетрациклину и ванкомицину.

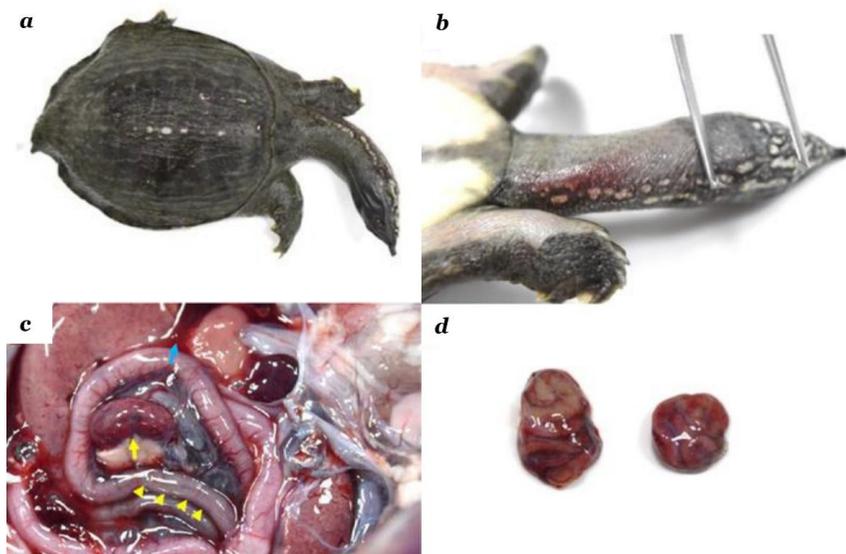


Рис. 9.3. Патологические изменения, вызванные *B. shinchuchen* var. *anthraxis*:
а – запрокидывание (опистотонус) шеи, б – кожные кровоизлияния,
с – скопление серозно-геморрагической жидкости (синяя стрелка), отёк серозной оболочки кишечника (желтый треугольник) и спленомегалия (жёлтая стрелка),
д – почечные кровоизлияния (по Cheng L.-W., 2023)

¹ О них, а также о «рвотных» штаммах подробнее поговорим в Главе 27.

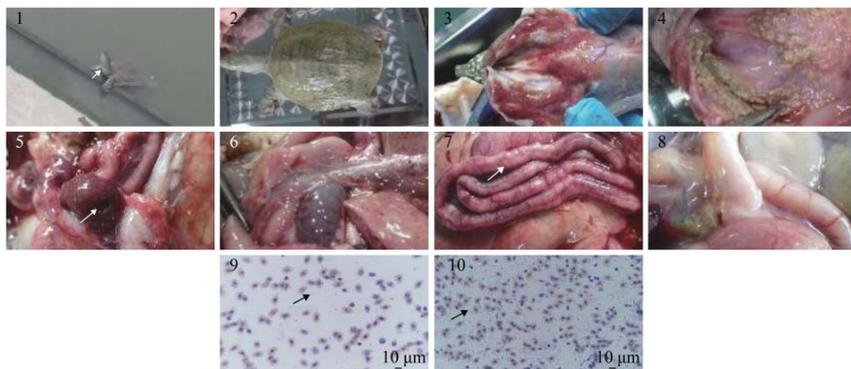


Рис. 9.4. Патологические изменения, вызванные *B. cereus* T91-1:

1 и 2 – запрокинутая, вытянутая и скрученная шея, 3 и 4 – гемморрагии околоушной железы, 5 и 6 – увеличенная тёмно-фиолетовая селезёнка, 7 и 8 – спазмированный гемморрагический кишечник, 9 и 10 – мазки-отпечатки крови и печени

(по 孟庆珍, 2019)

Вся описанная история с «сибирской язвой» черепах не представляла бы особого интереса, если бы не штаммы *B. cereus* BC 12, T91-1, XC0724 и Y271, которые изолируются от больных особей с 2013 года. Инфицированные ими черепахи, помимо вышеназванных симптомов, имеют отёки век, конечностей и изъязвления на панцире, а патологоанатомическая картина обычно включает покраснение слизистой оболочки рта, гемморрагии околоушной железы, почечные кровоизлияния, а также спазмированный гемморрагический кишечник (**Рис. 9.4** и **Рис.9.5**).

В целом клиническая картина не сильно отличается от описанной выше, однако геном указанных штаммов интересен тем, что в нём уже отсутствуют гены сибиреязвенного токсина (в частности, отёчный токсин), но присутствуют только гены токсинов, свойственные патогенным *B. cereus* ss, а именно «диарейные» (*hbl*, *nhe*, *cytK*, *entFM*, *bceT*) и «рвотный» (*ces*). Из этого закономерно вытекает вопрос: действительно ли только гены сибиреязвенного токсина ответственны за развитие инфекционного процесса или же ответственность за это лежит на иных генах, общих для всех этих штаммов? Ответить на этот вопрос пока трудно, и единственное, что мы можем сейчас сказать, что важную роль в патогенезе играют Toll-подобные рецепторы и воздействие на механизмы запасания желе-



Рис. 9.5. Патологические изменения, вызванные *B. cereus* Y271:

A – гиперемизированная кожа (стрелка); B – отёк шеи (наконечник) и века (звёздочка); C – гиперемия кожи (стрелка) и отёк шеи (наконечник); D – покраснение слизистой оболочки рта и жаберной ткани (треугольник); E – увеличение печени (стрелка); F – кровоизлияния в почке (треугольник), яйцевых трубках (звёздочка) и наружной стенке желудочно-кишечного тракта (наконечник); G – геморрагии (стрелка) и увеличение почки (по Xiao Z., 2023)

за¹. Однако одно ясно точно – эволюция *B. cereus* complex значительно сложнее и многообразнее, чем представлялось ранее, и мы становимся зрителями этого мистического процесса, каждый раз меняющего наше представление о нём.

10

КЛИНИКА КОЖНОЙ ФОРМЫ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ У ЧЕЛОВЕКА

Июль 2016 года², Турция. В амбулаторное отделение инфекционного профиля Ардаганской городской больницы (Ardaahan State Hospital) обращается 56-летняя женщина-фермер с жалобами на

¹ Cheng L.-W., Huang Q.-Y., et al. Transcriptome and pathophysiological analysis during *Bacillus cereus* group infection in *Pelodiscus sinensis* uncovered the importance of iron and toll like receptor pathway. Aquaculture. 2025; 594:741424; DOI: 10.1016/j.aquaculture.2024.741424.

² Çimen C. Typical evolution of a Cutaneous Anthrax lesion. Infect Dis Clin Microbiol 2020; 1: 27–29.

небольшой отёк правой руки и безболезненную припухлость тёмного цвета на среднем пальце этой руки (Рис. 10.1).

За неделю до этого на её ферме внезапно умерло несколько овец, ввиду чего женщина разделала их туши и через три дня обнаружила на правой руке поражение, по описанию соответствующее папуле, которое за два дня увеличилось и приобрело фиолетово-синий вид, оставаясь при этом безболезненным.

На обследовании было выявлено увеличение эпитрохлеарного (локтевого) лимфатического узла (около 3 см) и взята пункция для лабораторного исследования, которое выявило присутствие в пунктате грамположительных спорообразующих палочек, идентифицированных как *B. anthracis*, ввиду чего был поставлен диагноз «кожная сибирская язва».

Назначенная пациентке терапия, амоксициллин + клавулановая кислота¹ (3 г/день), привела к уменьшению отёка через 3 дня, а к 10-му дню образовался характерный сибиреязвенный струп с чёрной язвой и острыми краями в центре раны (Рис. 10.2), ввиду чего приём антибиотика был прекращён.

Кожная форма сибирской язвы составляет около 95 % всех случаев заболевания, и, по оценкам, ежегодно на неё приходится около 2000 случаев. Обычно эта форма характеризуется одиночным (редко множественным) **безболезненным** поражением кожи, которое может разрешиться самопроизвольно ввиду значительного присутствия нейтрофилов в месте инвазии, фагоцитоз возбудителя у которых завершён. Вместе с тем отсутствие лечения может привести к сепсису и летальному исходу в 5–20 % случаев. Контингентом риска обычно являются люди, работающие с животными или их шкурами (ранее эту форму также называли *болезнью сортировщиков шерсти*), поэтому чаще всего поражаются участки кожи, открытые для воздействия внешней среды, такие как руки, ноги, лицо и шея (в последнем случае возможно нарушение проходимости дыхательных путей). Интересно, что в некоторых регионах у мясников, работающих в тканевых фартуках, при просачивании крови животных поражается кожа живота. Публий Вергилий Марон в уже упоминаемой поэме «Георгики» писал: «Шкуры больных животных

¹ Также амоксиклав.

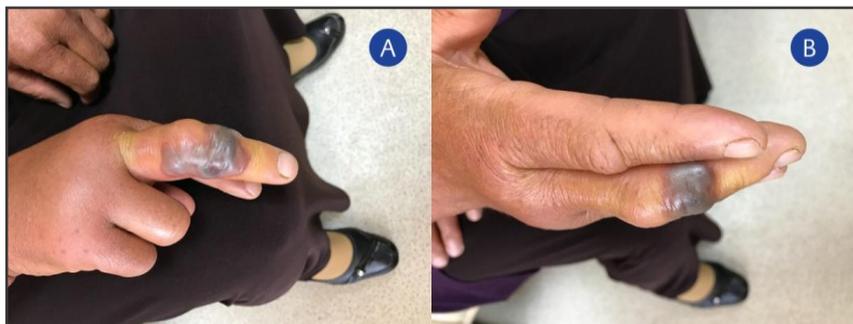


Рис. 10.1. Вид сверху (А) и сбоку (В) кожного поражения в день обращения (по Çi̇ten С., 2020)

Рис. 10.2.
Сибирезязвенный струп
с язвой, образовавшийся
на месте кожного пора-
жения, через 10 дней
после лечения
(по Çi̇ten С., 2020)



также были бесполезны, и ни вода, ни огонь не могли очистить их от этой заразы. Овцеводы не могли стричь шерсть, которая была пронизана болезнью и порчей... А ежели кто-то и осмеливался носить одежду из заражённой шерсти, то конечности его вскоре покрывались воспалёнными папулами со зловонным содержимым...»

Инкубационный период составляет от 1 до 5 дней, при этом первоначальные симптомы проявляются в виде везикулярной папулы, которая за 2–3 суток может развиваться сначала в безболезненную геморрагическую везикулу или карбункул, окружённый слабым отёком, а затем в везикулярное поражение, образующее после разрыва язву, которая, наконец, трансформируется в чёрный некротический струп (Рис. 10.3), который отторгается через 2–3 недели. Именно благодаря этому признаку болезнь получила название карбункул злокачественный, *charbon malin* и *anthrax*.



Рис. 10.3. Различные области локализации сибиреязвенного струпа (1930-е)



Рис. 10.4.
Эризипеллоидный вариант кожной формы сибирской язвы. Фотография любезно предоставлена Сапарбаем Тезекбаевичем Жолдошевым

Возможны варианты, когда на фоне выраженного отёка не видно карбункула (*эдематозный вариант*) либо когда формируются исключительно пузыри, наполненные геморрагическим содержимым (*буллёзный вариант*), которых может быть много, белого цвета и различной величины, наполненные прозрачной жидкостью (**Рис. 10.4**), на припухшей, покрасневшей коже (*эризипелоидный [буллёзный] вариант*). Первый вариант протекает тяжелее и, как третий, «трансформируется» в струп, тогда как второй разрешается некрозом. Кроме того, течение кожных проявлений обычно осложняется преклонным возрастом пациента, а также нарушением толерантности к глюкозе и сахарным диабетом II типа.

В 4 % случаев возможно развитие так называемой *пальпебральной сибирской язвы*, характеризующейся поражением века, которое даже на фоне лечения может в 47 % случаев привести к развитию рубцового эктропиона (т. е. рубцевания, при котором веко оттягивается от глазного яблока), в 19 % – лагофтальма (т. е. невозможностью сомкнуть веки) и в 9,5 % – рубцеванию роговицы (**Рис. 10.5**).

Миграция возбудителя в дренирующий лимфатический узел часто сопровождается локализованной лимфаденопатией (т. е. увеличением, в данном случае, ближайших к месту инвазии дренирующих лимфатических узлов), что мы видели у женщины из клинического случая. Однако нагноение возможно только в результате вторичного инфицирования, не связанного с сибирской язвой.

Крайне редко возможна гематогенная и лимфогенная диссеминация возбудителя через гематоэнцефалический барьер с молниеносным (менее чем за сутки) развитием *геморрагического менингоэнцефалита*, выраженного субарахноидальным, внутримозговым и внутрижелудочковым кровотечением (**Рис. 10.6**). Летальность даже на фоне лечения в этом случае составляет 96 %. Клинические проявления, как правило, включают одностороннюю гемиплегию (т. е. полный паралич одной из сторон тела), моторную афазию (т. е. нарушения произношения звуков) и возбудимость. Положительные рефлекс Бабинского¹, симптомы Кернига² и Брудзинского³.

¹ Предложен французским врачом польского происхождения Жозефом Бабинским (Joseph Jules François Félix Babinski; Józef Julian Franciszek Feliks Babiński;



Рис. 10.5. Пальпебральная сибирская язва у 9-летнего мальчика из Восточной Анатолии (Турция) до лечения (слева), на 6-й день лечения (посередине) и после отпадения струпа (справа). Он был госпитализирован с диагнозом «пресептальный целлюлит», однако на 5-й день лечения была заподозрена сибирская язва ввиду появления некроза и проживания в эндемичном районе. Выяснилось, что отец пациента работает мясником, из-за чего пациент имел контакт с сырым мясом. Кроме того, у брата пациента ранее была кожная форма сибирской язвы на пальце, поэтому можно предположить, что сам пациент либо его брат контактировали с веком (например, потёрли глаз). На 3-й день лечения отёк лица начал уменьшаться, а к 6-му дню появился характерный струп, который отпал на 43-й день. Офтальмологическое обследование выявило минимальный птоз левого глаза и улучшение структуры и контура века (по Teleke Kaumaz S., 2024)

1857–1932). **Методика:** в ответ на штриховое раздражение наружного края подошвы пациент непроизвольно разгибает большой палец ноги.

² Предложен российским врачом, терапевтом Владимиром Михайловичем Кернигом (1840–1917). **Методика:** в положении лёжа на спине пациенту пассивно сгибают нижнюю конечность в тазобедренном и коленном суставах под углом 90°. Ввиду тонического сокращения мышц, сгибающих голень, разогнуть ногу в коленном суставе пациенту самому оказывается невозможным. Следует помнить, что при наличии у пациента гемипареза симптом может оказаться ложноотрицательным, а у пожилых людей (при наличии мышечной ригидности) – ложноположительным.

³ Предложен польским врачом, педиатром Йозефом Брудзи́нским (Józef Brudziński; 1874–1917). **Верхний:** при пассивном сгибании головы непроизвольно сгибаются нижние конечности и подтягиваются к животу. **Средний** (лобковый): при давлении на лобок нижние конечности непроизвольно сгибаются в тазобедренных и коленных суставах. **Нижний:** при пассивном сгибании одной ноги в тазобедренном и коленном суставах под углом 90° (проверка симптома Кернига на одной конечности), вторая нога непроизвольно сгибается и подтягивается к животу. **Щёчный:** при надавливании на щёку ниже скуловой дуги непроизвольно поднимаются плечи и сгибаются верхние конечности в локтевых суставах.

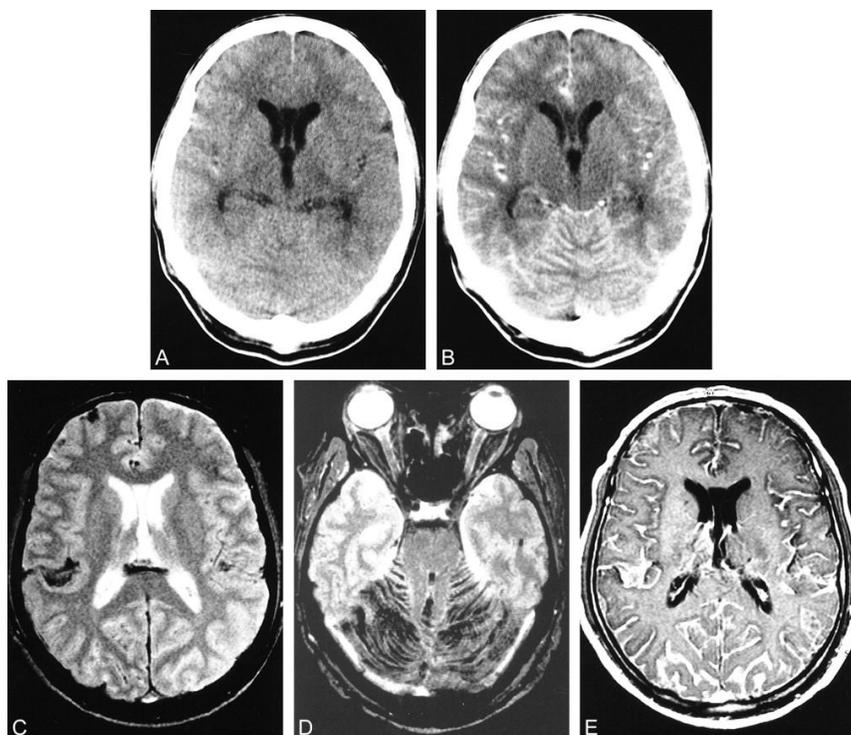


Рис. 10.6. Геморрагический менингоэнцефалит у 53-летнего мужчины из Пусана (Южная Корея), развившийся как осложнение кожной формы сибирской язвы. На преконтрастной (А) и контрастной (В) аксиальной компьютерной томографии, проведённой во время ступорного состояния пациента, можно видеть диффузное субарахноидальное кровоизлияние и лептоменингеальное усиление (т. е. накопление контрастного вещества «по ходу» извилин). На аксиальной T2-взвешенной градиентной эхо-магнитной резонансной томографии (С и D), проведённой на следующий день, когда пациент впал в кому, можно видеть диффузную тёмную интенсивность сигнала, указывающую на кровоизлияния в супра- и инфратенториальные субарахноидальные пространства. Аксиальная T1-взвешенная магнитная резонансная томография с контрастным усилением (Е) демонстрирует диффузное лептоменингеальное усиление (по Kim H. J., 2001; публикуется по лицензии the American Society of Neuroradiology; разрешение передано через the Copyright Clearance Center, Inc.). Обратите внимание, что, как и в случае штаммов *Vsobva*, возбудитель проник в паренхиму. Сравните эти снимки с Рис. 4.3.

Исход напрямую зависит от быстроты постановки диагноза. При патологоанатомическом исследовании помимо кровоизлияний на поверхности мозга и в субарахноидальном пространстве, как и в

случае штаммов Vcbva (Глава 4), можно обнаружить множественные геморрагические поражения на границе серого и белого вещества головного мозга, а также бактериальное присутствие в паренхиме. Интересно, что такие симптомы, как лихорадка, озноб, тошнота, рвота и боли в животе на фоне кожной формы сибирской язвы указывают на развитие менингита^{1>}.

В 9 % случаев болезнь может сопровождаться болью, а также лихорадкой и общей усталостью. Возможны лейкоцитоз (до $80 \times 10^9/\text{л}$ при норме $4-9 \times 10^9/\text{л}$), характеризующийся значительным повышением количества нейтрофилов, гипоальбуминемия (т. е. снижение уровня альбумина в сыворотке крови ниже 35 г/л) и повышением аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы. В случаях, прогрессирующих до тяжёлой токсемии, могут возникнуть лейкопения, тромбоцитопения и даже коагулопатия (ДВС-синдром).

Примером тяжёлого течения служит следующий случай.

6 августа 2024 года^{2>}, Китай. В Первую народную больницу Шицзуйшаня (*The First People's Hospital of Shizuishan*), филиал Медицинского университета Нинся (*Ningxia Medical University*), поступает мужчина с болезненным отёком указательного пальца правой руки (Рис. 10.7-а), ограничивающим его движение (температура ткани поражённой области также была несколько выше температуры ткани соседних областей).

За неделю до этого имели место укусы насекомого (в эту область), а также контактирование и употребление в пищу заражённой сибирской язвой говядины в эндемичном районе. На момент поступления обнаружены лейкоцитоз ($10,98 \times 10^9/\text{л}$ при норме $4-9 \times 10^9/\text{л}$), сопровождающийся повышением количества нейтрофилов ($8,18 \times 10^9/\text{л}$ при норме $0,04-0,3 \times 10^9/\text{л}$), а также значительное повышение уровня С-реактивного белка ($67,45 \text{ мг/л}$ при норме до 5 мг/л) и скорости оседания эритроцитов (55 мм/ч при норме до 20 мм/ч), что указывает на развитие инфекционного

¹ Bower W. A., Yu Y., et al. *CDC Guidelines for the prevention and treatment of Anthrax*, 2023. MMWR Recomm Rep. 2023; 72(6):1-47; DOI: 10.15585/mmwr.rr7206a1.

² Du Y., Ma J., et al. *In-depth exploration of cutaneous anthrax: clinical and pathological manifestations of a case report*. Diagn Pathol. 2024; 19:158; DOI: 10.1186/s13000-024-01587-x.



Рис. 10.7. Процесс заживления раны (по Du Y., 2024)

процесса. На компьютерной томографии грудной клетки обнаружены множественные увеличенные лимфатические узлы в поражённой подмышечной впадине с окружающим воспалением. Осмотр правой руки также выявил присутствие воспалительного экссудата в подкожной мышце и локальный некроз мышц. Гистологические исследования (Рис. 10.8) показали гиперкератоз эпидермиса с выраженным отёком, некрозом, пролиферацией коллагеновых волокон, кровоизлиянием и нейтрофильной инфильтрацией в поверхностной дерме. Кроме того, придаточные структуры в дерме отсутствовали, наблюдались остаточные нервные волокна, а локализованная грануляционная ткань и многоядерный гиганто-клеточный ответ были отмечены в окружающей строме.

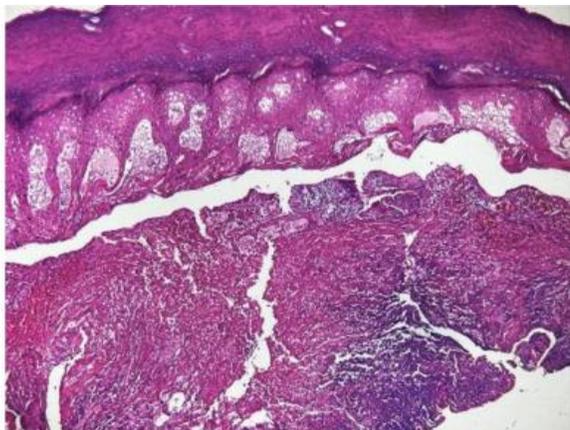


Рис. 10.8. Структурные поражения кожи; ув. 100х
(по Du Y., 2024)

Ввиду подозрения на сибирскую язву мазки экссудата и посевы были направлены в Центр по контролю и профилактике заболеваний Нинся-Хуэйского автономного района (Ningxia Hui Autonomous Region Center for Disease Control

and Prevention), где подтвердили присутствие ДНК *B. anthracis*. Несмотря на то, что вегетативные клетки и споры сибиреязвенного микроба обнаружены не были, на основании клинической картины и эпидемиологического анамнеза был поставлен диагноз «кожная сибирская язва». Учитывая открытые поражения и возможность системного распространения, начата терапия меропенем (1 г) внутривенно каждые 8 часов и доксициклин (0,1 г) каждые 12 часов.

Через 3 дня пациент сообщил об снижении болевых ощущений, уменьшении отёка и увеличении площади струпа, при этом визуальный осмотр показал подсыхание раны и образование корки (Рис. 10.7-б). На компьютерной томографии грудной клетки отмечено уменьшение размера поражённых подмышечных узлов, свидетельствующее о положительном ответе на лечение, ввиду чего терапия была изменена на пенициллин (3,2 млн ед.) внутривенно каждые 8 часов и доксициклин (0,1 г) per os дважды в сутки.

К 12 августа рана была полностью сухой и покрытой коркой (Рис. 10.7-с), подмышечные лимфатические узлы и лабораторные анализы пришли в норму. Тем не менее в мазках экссудата по-прежнему идентифицировалась ДНК *B. anthracis*, поэтому антибиотикотерапия была продолжена. 20 августа рана была полностью сухой и покрыта струпом (Рис. 10.7-д), поэтому пациент был выписан, но продолжил принимать доксициклин (0,1 г) per os

дважды в день. Контрольный осмотр показал затягивание раны без «обугливания» (отторжение струпа) с образованием лишь незначительных рубцов (Рис. 10.7-е).

5 декабря 2009 года¹. У 24-летней девушки появились гриппоподобные симптомы, такие как усталость, лихорадка, головная боль и диффузные боли в теле, за которыми последовали кашель, а также колющие боли в животе и пояснице. Через шесть дней добавились тошнота и рвота. Поздно вечером 14 декабря она обратилась в поликлинику, откуда немедленно была доставлена в отделение неотложной помощи местной больницы, где при осмотре она выглядела уставшей и беспокойной. На момент поступления выявлен лейкоцитоз ($43,3 \times 10^9/\text{л}$ при норме $4\text{--}9 \times 10^9/\text{л}$).

15 декабря её переводят в Общую больницу Массачусетса (The Massachusetts General Hospital), Содружество Массачусетс, США, где на момент поступления артериальное давление составляет $98/58 \text{ ммHg}$, частота сердечных сокращений 122 уд/мин , частота дыхания 22 вдоха/мин , температура $36,7 \text{ }^\circ\text{C}$. Живот вздутый и диффузно болезненный, но с нормальными кишечными шумами. Обнаружен незначительный лейкоцитоз ($14,2 \times 10^9/\text{л}$ при норме $4\text{--}9 \times 10^9/\text{л}$), выраженная тромбоцитопения ($15 \times 10^9/\text{л}$ при норме $180\text{--}320 \times 10^9/\text{л}$), анемия (54 г/л при норме $120\text{--}140 \text{ г/л}$), повышенное значение активированного частичного тромбопластинового времени (150 сек при норме $25,1\text{--}36,5 \text{ сек}$) и протромбинового времени ($37,2$ при норме $10\text{--}13,2 \text{ сек}$), что в совокупности указывает на развитие инфекционного процесса и внутреннее кровотечение.

¹ Klempner M. S., Talbot E. A., et al. Case 25–2010 – A 24-year-old woman with abdominal pain and shock. N Engl J Med 2010; 363:766–777; DOI: 10.1056/NEJMcpc1003887; Mayo L., Dionne-Odom J., et al. Gastrointestinal anthrax after an animal-hide drumming event - New Hampshire and Massachusetts, 2009. MMWR. 2010; 59(28):872–877.

В течение следующих 3 часов усиливаются боль в животе (самооценка: 8 из 10) и вздутие, ввиду чего вводится нестероидный противовоспалительный препарат (кеторолака трометамин) и назогастральный зонд, после чего имеет место снижение артериального давления. Образцы крови отправлены на исследование (через 15 часов обнаружены грамположительные палочки), введены физиологический раствор и эртапенем. Результаты трансторакальной эхокардиографии (Эхо-КГ) патологии не выявили. На контрастной компьютерной томографии грудной клетки обнаружены двусторонние средние слои плевральных выпотов с коллапсом нижних долей и частичным коллапсом верхних долей. В аэрируемых частях лёгких имеются очаговые затемнения, представляющие либо воспаление, либо инфекционный процесс. На контрастной компьютерной томографии брюшной полости и таза (Рис. 11.1) выявлены значительный асцит (т. е. скопление свободной жидкости в брюшной полости), отсутствие расширения кишечника и концентрическое утолщение стенки длинного сегмента дистального отдела тонкой кишки, приведшие к развитию шока. В корне брыжейки тонкой кишки и в забрюшинном пространстве выявлены многочисленные слегка увеличенные лимфатические узлы. На диагностической (экспериментальной) лапаротомии (Рис. 11.2) подтверждён асцит (3 литра), который был дренирован, а также узловатые геморрагические поражения в брыжейке и две области некроза тонкой кишки. Образцы биопсии из брыжеечных поражений и кишечника направлены на исследование, а некротизированные участки тонкой кишки и аппендикс резецированы (т. е. удалены). Позднейшие исследования этих органов выявили трансмуральное кровоизлияние, отёк и острое воспаление с некрозом в образце тонкого кишечника, а также диффузное кровоизлияние с острым воспалением и некрозом в образце лимфатического узла. В обоих образцах были обнаружены значительные бактериальные скопления (Рис. 11.3). Кроме того, в просвете тонкого кишечника и аппендикса было обнаружено несколько остриц *Enterobius vermicularis*, что указывает на сопутствующую нематодную инфекцию.

На фоне прогрессирования гипотонии и дыхательной недостаточности проведена повторная лапаротомия, выявившая забрюшинную гематому, которая была удалена. После операции состоя-

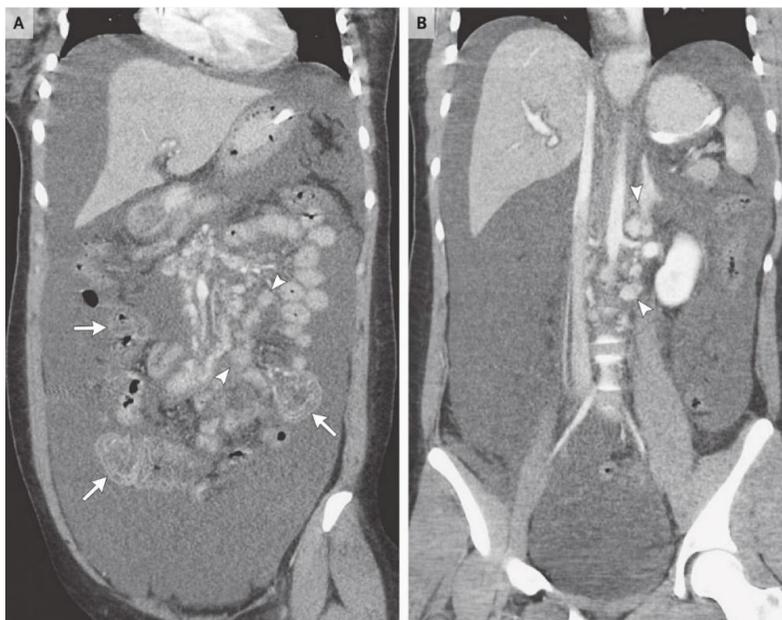


Рис. 11.1. Контрастная компьютерная томография брюшной полости и таза, демонстрирующая большое количество асцита, отсутствие расширения кишечника и концентрическое утолщение стенки длинного сегмента дистального отдела тонкой кишки (А, стрелки). В корне брыжейки тонкой кишки (А, наконечники стрелок) и в забрюшинном пространстве (В, наконечники стрелок) обнаруживаются многочисленные слегка увеличенные лимфатические узлы, накапливающие значительное количество контрастного вещества (по Klempner M. S., 2010; Copyright © 2010 The Massachusetts Medical Society; публикуется по лицензии правообладателя)

Рис. 11.2. Диагностическая лапаротомия на 7-й день госпитализации. Обнаружены асцит, сгустки крови в тазу и большая внутрибодочная ретроперитонеальная гематома, которая распространилась на бифуркацию магистральных сосудов и захватила начало почечных артерий. Кишечные анастомозы целы, признаков ишемии внутренних органов не выявлено (фотография Dr. Z. Vamboot и Dr. D. King, по Klempner M. S., 2010; Copyright © 2010 The Massachusetts Medical Society; публикуется по лицензии правообладателя)



фотография Dr. Z. Vamboot и Dr. D. King, по Klempner M. S., 2010; Copyright © 2010 The Massachusetts Medical Society; публикуется по лицензии правообладателя)

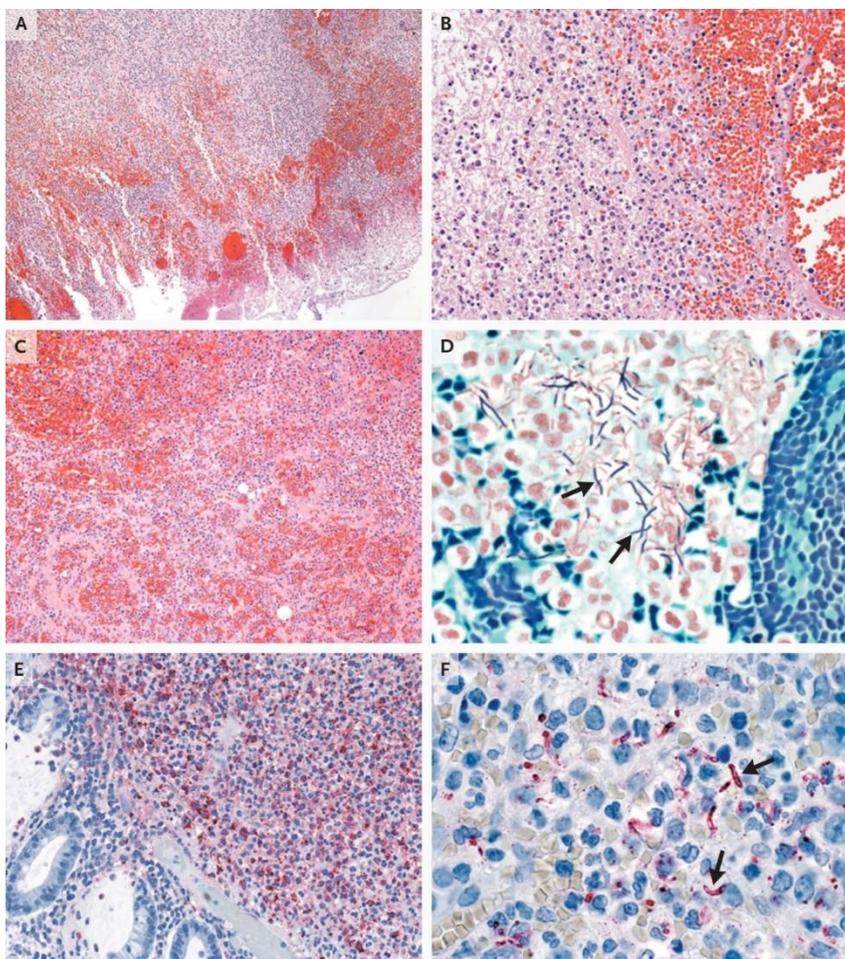


Рис. 11.3. Патологические изменения в образцах биопсии кишечника и брыжеечных лимфатических узлов; окраска гематоксилин-эозином (А-С), по Lillie-Twort Gram (D), иммуногистохимическое окрашивание с гематоксилином (Е и F). В образцах кишечника можно видеть острый некротический энтерит с изъязвлением слизистой оболочки и кровотечением (А), а также острое геморрагическое воспаление с большим количеством нейтрофилов (В) и незначительным количеством бактерий (D, стрелки), которые обильно присутствуют в подслизистой оболочке кишечника (Е, красный). Исследование брыжеечного лимфатического узла указывает на острый некротизирующий и геморрагический лимфаденит со стиранием архитектуры лимфатического узла (С), а также присутствием неповреждённых (F, стрелки) и фрагментированных бактерий (по Klempner M. S., 2010; Copyright © 2010 The Massachusetts Medical Society; публикуется по лицензии правообладателя)

ние пациентки стабилизировалось, поэтому её перевели на долечивание в специализированную больницу, где 24 декабря был поставлен диагноз «желудочно-кишечная форма сибирской язвы с развитием сепсиса» на основании исследования бактериальной культуры из образцов крови, что инициировало проведение эпидемиологического расследования. Спустя два месяца пациентка была выписана.

Ввиду тяжёлого её состояния на момент 24 декабря эпидемиологический анамнез был собран специалистами у родственников и друзей, который уже 4 января 2010 года подтверждён самой пациенткой. Она была веганкой и время от времени участвовала в органическом земледелии последний раз в сентябре 2009 года (вполне вероятно, что пренебрежение правилами личной гигиены стало причиной заражения острицами), причём за 6 месяцев до описываемых событий, во время работы на органической ферме, на задней поверхности её левой голени образовался отёчный узелок, который был принят за последствие укуса насекомого. Узелок был несколько приподнятым, тёплым и болезненным, достигал в диаметре 4 см, несмотря на десятидневный курс антибиотикотерапии (амоксциллин + клавулановая кислота). Разрез и дренаж обнаружили большое количество серозно-гнойной жидкости, однако её посевы были стерильными (что, по всей вероятности, обусловлено действием антибиотиков). Был назначен ципрофлоксацин, на фоне приёма которого в течение ещё 2 недель выделялась серая жидкость, однако за 2 месяца до госпитализации наступило выздоровление, что исключает это событие из числа источников заражения. За границу пациентка также не выезжала, жила с семьёй, работала с детьми и вела активный образ жизни. 4 декабря она посетила мероприятие по игре на барабанах (впервые), где употребляла взятую с собой пищу, и помимо своего барабана из синтетической кожи также играла на барабанах из натуральной кожи животного (Рис. 11.4). Поскольку это была единственная «зацепка» (ранее регистрировались случаи инфицирования от шкур барабанов), специалистами были отобраны пробы с 54 барабанов, оставшихся в здании, с 2 барабанов пациентки (один из синтетической кожи и один из натуральной) и с 10 барабанов участников мероприятия. Кроме того, было отобрано 6 проб окружающей среды.



Рис. 11.4. Барабаны и обеденный стол. Стрелкой указан барабан, из кожи которого был выделен *B. anthracis*

Сибирезывенный микроб был идентифицирован в трёх образцах: с двух барабанов и одной электрической розетки в комнате, где проходило мероприятие. Контакт с обоими барабанами пациентка отрицала, и поскольку она была веганкой (т. е. не могла употребить заражённое мясо), вопрос механизма заражения оставался неясным и интригующим. Была высказана гипотеза, что заражение произошло от проглатывания аэрозолированных спор возбудителя с кожи барабанов (при этом непонятно, вдохнула она в ротоглотку заражённый аэрозоль или он контаминировал её продукты). Интересно, что один из барабанов имел большие размеры и был изготовлен 10–15 лет назад в Мали из коровьей кожи с волосами на верхней и нижней поверхностях. Он был куплен на распродаже и хранился в подвале здания с 2007 года. Второй барабан был небольшим. Он был куплен в антикварном магазине и хранился с 2000 года. Случаев заражения от этих барабанов до описываемого события не установлено. Все выделенные бактериальные культуры (пациент, барабаны, розетка) принадлежали к группе A.Br.001a и имели идентичные однонуклеотидные мутации, отличающие их от известных на тот момент штаммов сибирезывенного микроба, что подтверждает высказанную гипотезу механизма заражения.

В качестве контактных (в данном случае тех, кто также мог подвергнуться заражению) выделено 210 лиц, из которых 84 счи-

тались потенциально подвергшимся заражению, ввиду чего им была предложена постконтактная профилактика, от которой отказалось 26 человек¹. Новых случаев заболевания не зарегистрировано.

Уникальность данного случая заключается в том, что из всех ранее зарегистрированных случаев инфицирования аэрозолем, сформировавшимся во время барабанной дробы, он является первым, при котором реализовался не воздушно-пылевой, а алиментарный путь заражения, приведший при минимальной инфицирующей дозе к развитию желудочно-кишечной формы сибирской язвы, при том, что заражения иных участников мероприятия не произошло. И в этом случае большой заслугой эпидемиологов стало то, что они учли важный фактор: пациентка была веганом, соответственно, не могла заразиться от употребления в пищу контаминированного мяса, поэтому они смогли «отбросить» очевидный и большой путь эпидемиологического расследования, сконцентрировавшись на маловероятном, который и подтвердился. Обычно заражения от шкур барабанов приводят к развитию кожных и лёгочных форм, но в данном случае, вероятно, споры были либо относительно большими, либо слипшимися, ввиду чего относительно тяжёлый аэрозоль проглатывался. Также надо помнить, что барабаны долго стояли и были покрыты толстым слоем пыли, поэтому споры могли «взлететь» вместе с пылью. И хотя эти пути заражения на первый взгляд могут показаться неочевидными, результаты молекулярно-генетического исследования подтверждают их состоятельность. Таким образом, данный случай не только иллюстрирует гастроинтестинальное течение желудочно-кишечной формы сибирской язвы, но и наглядно показывает важность, казалось бы, несущественной для эпидемиологического расследования информации и роль хорошего эпидемиолога в здравоохранении.

Желудочно-кишечная форма сибирской язвы встречается редко и обычно связана с употреблением в пищу продуктов, контаминированных спорами возбудителя, которые могут инвазировать желудочно-кишечный тракт в любом месте от ротовой полости до сле-

¹ То есть почти 31 %, что указывает на низкую эффективность работы по санитарному просвещению населения, которая является важной составляющей санитарной охраны.

пой кишки. Поэтому в рамках данной формы принято выделять *гастроинтестинальное* течение и *орофарингеальное*¹, которые часто указываются в качестве самостоятельных форм, что не очень правильно с эпидемиологической точки зрения, но оправдано с клинической. Ввиду сложностей клинической диагностики, вызванной столь большим пространством возможной инвазии, летальность при данной форме составляет 25–60 %.

Инфекционный процесс при *гастроинтестинальном* течении чаще всего протекает в кишечнике ввиду оседания спор на пространстве от тонкой до слепой кишки. Инкубационный период обычно составляет 15–72 часа, после чего развитие идёт подобно кожной форме с образованием язв (только внутри организма, из-за чего и сложности диагностики), сопровождающихся отёком подслизистой оболочки кишечника, мезентериальным лимфаденитом² и асцитом (действие отёчного фактора), которые могут привести к кишечной непроходимости, кровотечению и перфорации. Часто имеют место неспецифические желудочно-кишечные симптомы, такие как тошнота, рвота, боли в животе или диарея. В более тяжёлых случаях развиваются лихорадка, увеличение окружности живота, шок и сепсис, которые могут привести к смерти.

Инфекционный процесс при *орофарингеальном* течении протекает в глотке, ввиду оседания в ней спор, и наиболее часто локализуется на её задней стенке, основании языка и миндалинах, значительно реже – на твёрдом нёбе. Примером может служить вспышка, произошедшая в марте – апреле 1982 года³ в Чиангаме (северный Таиланд), во время которой в результате употребления в пищу мяса заражённых буйволов орофарингеальная форма была диагностирована у 24 человек (23 из них госпитализированы). У ещё 52 человек обнаружилась кожная форма заболевания, которая нередко сочетается с орофарингеальной. Инкубационный период составил 2–144 часа. У всех пациентов с орофарингеальной сибирской яз-

¹ Напомним: также встречается у свиней (см. Главу 8).

² Также мезаденит, то есть воспаление и нагноение лимфатических узлов, расположенных в брыжейке, окружающей тонкую кишку.

³ Sirisanthana T., Navachareon N., et al. *Outbreak of oral-pharyngeal anthrax: an unusual manifestation of human infection with Bacillus anthracis*. Am J Trop Med Hyg. 1984; 33(1):144–150; DOI: 10.4269/ajtmh.1984.33.144.



Рис. 11.5. Выраженный односторонний отёк (слева) у 29-летнего мужчины на 1-й день заболевания; появление белого пятна в месте инвазии на фоне отёка и застоя в правой миндалине, распространяющихся на переднюю и заднюю ножки зева, а также мягкое нёбо и язычок (справа верхнее) на 5-й день заболевания и появление псевдомембраны (справа нижнее) на 9-й день заболевания у 27-летнего мужчины (по Sirisanthana T., 2002)

вой имелся болезненный отёк подкожно-жировой клетчатки лица и шеи, вызванный увеличением шейных лимфатических узлов и отёком мягких тканей. У всех, за исключением одного, была лихорадка. Кроме того, имели место боль в горле, дисфагия и осиплость голоса. Поражения полости рта располагались на миндалинах, задней стенке глотки или твёрдом нёбе. В тяжёлых случаях поражения миндалин распространялись на переднюю и заднюю ножки зева, а также на мягкое нёбо и язычок. Ранние поражения были отёчными и застойными. К концу первой недели центральный некроз и изъязвление приводили к образованию беловатого пятна, из которого изолировался возбудитель. На второй неделе этот участок превращался в псевдомембрану, покрывающую язву (Рис. 11.5). Несмотря на антибиотикотерапию, летальность при этой вспышке составила 12,4 %, а самая высокая летальность, 50 %,



Рис. 11.6. Гингивит у 3-летнего мальчика
(по Попова А. Ю. [ред.], 2017)

и двухсторонний) был безболезненный, поэтому болезненность не является существенным признаком. Кроме того, отмечалось развитие распространённого безболезненного гипертрофического гингивита (Рис. 11.6), что может быть следствием поступления возбудителя в виде вегетативных клеток, а не спор, поскольку пищевая культура жителей Ямала (ненцев, селькупов и хантов) предполагает употребление в пищу свежеразделанного мяса животного, а также его крови (у живой особи подрезают вену). Однако даже приготовленное мясо может представлять опасность. В условиях холодильника в неразделанной туше вегетативные клетки сибиреязвенного микроба могут сохраняться до 11 дней, а в 1 кг инфицированного мяса может быть до миллиона микробных клеток. При этом считается, что разделанное проваренное мясо не может привести к заражению ввиду гибели клеток во время термической обработки. Однако при хранении на поверхности мяса образуются споры (примерно за 7 часов), которым не страшно замораживание и термическая обработка.

Рассмотрим ещё один случай.

¹ Doğanay M., Almaç A., et al. *Primary throat anthrax. A report of six cases.* Scand J Infect Dis. 1986; 18(5):415–419; DOI: 10.3109/00365548609032357.

² *Опыт ликвидации вспышки сибирской язвы на Ямале в 2016 году.* Под редакцией А. Ю. Поповой, А. Н. Куличенко, Ижевск: ООО «Принт-2», 2017, 313 с.

2009 год¹, Газиантеп, Турция. 42-летняя женщина была госпитализирована в Городскую больницу Шехиткамил (Şehitkamil State Hospital) с жалобами на отёк, начавшийся с правой стороны шеи и распространившийся на остальную часть шеи и грудь, затруднённое глотание и дыхание, озноб и лихорадку. Пациентка проживала в сельской местности, занималась животноводством и за 2 дня до появления симптомов приготовила и ела мясо животного, признанного ветеринарным врачом больным (болезнь не уточнялась).

На момент поступления артериальное давление составляет 110/60 ммHg, частота сердечных сокращений 76 уд/мин, температура 37,8 °С. Обнаружены незначительный лейкоцитоз ($13,3 \times 10^9/\text{л}$ при норме $4\text{--}9 \times 10^9/\text{л}$), характеризующийся повышением нейтрофилов до 86 % (норма 34–70 %), выраженная тромбоцитопения ($14,4 \times 10^9/\text{л}$ при норме $180\text{--}320 \times 10^9/\text{л}$), значительное повышение уровня С-реактивного белка (24 мг/л при норме до 5 мг/л) при нормальной скорости оседания эритроцитов (13 мм/ч при норме до 20 мм/ч), повышение мочевины (11,2 ммоль/л при норме 2,6–6,7 ммоль/л).

По всей шее наблюдается безболезненный отёк, более выраженный с правой стороны, а также в верхней трети грудной клетки. При пальпации выявлены несколько лимфатических узлов, но оценка их размера затруднялась отёком. При осмотре глотки обнаружена масса, напоминающая абсцесс, полностью покрывающая заднюю стенку глотки (Рис. 11.7). На компьютерной томографии шеи обнаружена дольчатая масса размером 3 x 2,5 x 4 см, сужающая трахею, а также многочисленные увеличенные конгломерированные лимфатические узлы с максимальным размером 3,2 см в правой подчелюстной, подъязычной и шейной областях (Рис. 11.7). Также имеется большое количество жидкости в перевертебральном пространстве, простирающееся от ротоглотки до верхнего средостения.

В образцах абсцесса (массы, взятой из глотки) обнаружен сибирезвенный микроб, ввиду чего поставлен диагноз «орофарингеаль-

¹ Akbulut A., Akbulut H., et al. *Gastrointestinal Anthrax: a case and review of literature*. Advances and Infectious Diseases. 2012; 2:67–71; DOI: 10.4236/aid.2012.23010; Ozdemir H., Demirdag K., et al. *Anthrax of the gastrointestinal tract and oropharynx: CT findings*. Emerg Radiol. 2010; 17:161–164; DOI: 10.1007/s10140-009-0821-y.

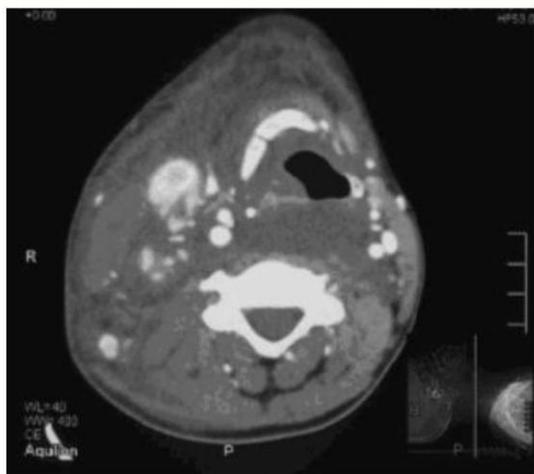


Рис. 11.7. Масса, напоминающая абсцесс с более тёмным цветом в центре, полностью покрывающая заднюю стенку глотки (верхнее), а также компьютерная томография шеи (среднее), обнаруживающая сужающую трахею массу и увеличенные лимфатические узлы, и контрастная компьютерная томография брюшной полости (нижнее), подтверждающая кровотечение в районе верхней брыжеечной артерии (по Akbulut A., 2012)

ная сибирская язва» (образцы крови свободны от патогена). Начата терапия пенициллин G (24 млн ЕД/сут) и левофлоксацин (500 мг) внутривенно, однако из-за диспноэ (т. е. одышки) был добавлен дексаметазон (8 мг) внутривенно и криотерапия (холодный пар).

На следующий день отёк шеи и груди начал спадать, а на их месте развился экхимоз (т. е. подкожное кровоизлияние). Проницаемость дыхательных путей также улучшилась. Общее состояние на 4-й день госпитализации хорошее, анализы крови пришли в норму. На 6-й день госпитализации имело место значительное заживление абсцесса, а единственным симптомом оставалась дисфагия (т. е. нарушение глотания). Однако, несмотря на то, что пациентке рекомендовали не трогать абсцесс, она вытаскивала его пальцем, о чём медицинскому персоналу сообщил её муж. Пациентка подтвердила это, указав на то, что проглотила вытекающую из него жидкость (вполне вероятно, она содержала большое количество сибирезвённого токсина)¹.

Через два дня у пациентки началась кровавая дефекация (4 раза в день), температура поднялась до 37 °С, артериальное давление составило 130/80 ммHg, частота сердечных сокращений 105 уд/мин. Появились бледность кожных покровов и склер, вздутие живота, снижение тонуса кишечника, болезненность при пальпации, а также мелена², указывающая на кишечное кровотечение (также в кале обнаружено большое количество эритроцитов и несколько лейкоцитов). Вновь обнаружили лейкоцитоз ($23,6 \times 10^9/\text{л}$ при норме $4-9 \times 10^9/\text{л}$), характеризующийся повышением нейтрофилов до 86 % (норма 34–70 %), выраженная тромбоцитопения ($11,5 \times 10^9/\text{л}$ при норме $180-320 \times 10^9/\text{л}$), снижение функции печени (аланинаминотрансфераза – 51 ед/л при норме до 31 ед/л; аспартатаминотрансфераза – 83 ед/л при норме до 31 ед/л). Пероральное питание прекращено, начаты поддерживающая терапия и переливание крови. В образцах крови обнаружено присутствие сибирезвённого микроба.

¹ Данное событие наглядно показывает необходимость санитарного просвещения населения, а также чёткого информирования пациента о возможных последствиях.

² То есть чёрный полужидкий стул с неприятным запахом, образующийся из переваренной крови. Свидетельствует о кровотечениях в верхних отделах желудочно-кишечного тракта.

Ультразвуковое исследование брюшной полости выявило рассеянную и обильную жидкость в районе печени, селезёнки и петель кишечника. Выполнено удаление жидкости из брюшной полости (парацентез); исследование жидкости показало значительное присутствие эритроцитов. Эндоскопия пищевода и желудка не проводилась ввиду наличия орофарингеального абсцесса, а колоноскопия выявила множественные язвы в толстой кишке (в просвете толстой кишки кровотечения не наблюдалось, но содержимое было кровянистым). На контрастной компьютерной томографии брюшной полости обнаружена экстравазация («подтекание») контрастного вещества вокруг областей, покрытых верхней брыжечной артерией (Рис. 11.7), а также в восходящей ободочной кишке.

Хирургическое вмешательство отложено ввиду наличия мелены, отёка тонкой кишки, скопления жидкости между кишечными петлями, наличия язв в толстой кишке и ухудшения общего состояния. Продолжено переливание крови, однако далее развилось септическое состояние с признаками тахикардии, гипотонии и тахипноэ (т. е. учащённое поверхностное дыхание), и, несмотря на антибиотикотерапию, на 17-й день госпитализации пациентка скончалась.

Приведённый клинический случай наглядно демонстрирует, что орофарингеальное течение сибирской язвы может быть как локализованным, так и переходящим в гастроинтестинальное (в том числе по глупости пациента). Отсутствие выраженного эффекта от антибиотикотерапии в данном случае можно объяснить действием токсина из проглоченной жидкости, а не размножением бактерий. Дело в том, что обычно проглоченные споры (реже вегетативные клетки) закрепляются на каком-то ограниченном пространстве по длине желудочно-кишечного тракта и колонизируют его, поэтому изъязвления появляются именно на этом пространстве, как мы видели в первом клиническом случае. Здесь же жидкость (токсин) прошла через весь желудочно-кишечный тракт, поразив значительное его пространство без существенного участия размножающихся бактерий.

17 октября 2010 года^{1>}, Ош, Кыргызстан. 55-летний мужчина почувствовал недомогание, сопровождающееся головной болью и жаром. На следующий день на левой кисти появилось два зудящих пятнышка, похожие на укусы насекомых, которые через некоторое время превратились в пузырьки (Рис. 12.1), а затем вскрылись с образованием язв.

20 октября родственники на попутных машинах доставили его в Ошскую межобластную объединённую клиническую больницу (Ош облустар аралык бириккен клиникалык ооруканасы). При первичном осмотре пациент вялый, заторможенный, на вопросы отвечает односложно. Температура тела 37 °С. На тыльной и внутренней ладонной поверхностях левой кисти обнаружены две безболезненные плоские сухие язвы диаметром 1 см, покрытые плотным чёрным струпом. Ткани вокруг язв отёчны, отёк распространён до плеча, местами имеются пузырьки (Рис. 12.1). Левый подмышечный лимфатический узел безболезненный при пальпации, увеличен. Сердечные тоны приглушены, ЧСС 105 уд/мин, АД 90/70 ммHg. Дыхание жёсткое, частое, поверхностное, частота дыхания 30–35 уд/мин. Обнаружены лейкоцитоз ($29,7 \times 10^9/\text{л}$ при норме $4\text{--}9 \times 10^9/\text{л}$), повышенная скорость оседания эритроцитов (38 мм/ч при норме до 20 мм/ч), гипергликемия ($9,7 \text{ ммоль/л}$ при норме $3,3\text{--}5,5 \text{ ммоль/л}$). На рентгенограмме органов грудной клетки обнаружены инфильтрация в нижней доле левого лёгкого, хронический бронхит, пневмосклероз (т. е. замещение лёгочной ткани соединительной), расширение границы сердца влево.

Имеются ригидность мышц затылка (ключевой показатель раздражения мозговых оболочек); положительные симптомы Кернига и Брудзинского (верхний, средний и нижний). Исследование ликвора показало повышенное содержание белка ($0,94 \text{ г/л}$ при норме $0,15\text{--}0,45 \text{ г/л}$) и плеоцитоз, то есть значительное содержание клеток ($2,02 \times 10^9/\text{л}$ при норме до $8 \times 10^6/\text{л}$), из которых 27,2 % лейкоциты и 72,8 % нейтрофилы.

¹ Жолдошев С. Т. *Случай кишечной формы сибирский язвы*. Журнал инфектологии. 2011; 3(3): 111–113; DOI: 10.22625/2072-6732-2011-3-3-111-113.



Рис. 12.1. Поражения кожи на 2-й, 4-й и 6-й день заболевания (по Жолдошев С. Т., 2011)

В результате эпидемиологического расследования установлено, что за два дня до появления первых симптомов заболевания пациент перетаскивал туши трёх павших телят. Две из них он закопал, а третью разделал на мясо (позднее из образцов печени выделен сибиреязвенный микроб). Поставлен предварительный диагноз (до бактериологического подтверждения) «кожная форма сибирской язвы с переходом в септическую», поскольку зараже-

ние произошло на эндемичной территории, кожный артефакт (язва) безболезненный, начало заболевания острое и сопровождалось лихорадкой, интоксикацией, вторичным менингоэнцефалитом, левосторонней нижнедолевой пневмонией. Начата терапия пенициллин (4 млн ЕД 6 раз в сутки) и ципрофлоксацин (100 мг 2 раза в сутки) внутривенно, а также антисибиреязвенный иммуноглобулин (80 мл внутримышечно), преднизолон (180 мг внутривенно), инфузионно-дезинтоксикационная терапия с форсированным диурезом.

Несмотря на проводимую терапию, состояние ухудшалось, и на 2-й день пребывания в стационаре (21 октября) сознание стало угнетено до состояния сопора, то есть утраты способности к произвольной деятельности и сохранения лишь рефлексов: пациент реагировал только на громкие окрики и инъекции. На 3-й день сознание вернулось, способен отвечать на вопросы, однако на утро 4-го дня повысилась температура (37 °С), появилась одышка в покое, пациент стал беспокойным. На фоне отёка появились геморрагические пятна, быстро увеличивавшиеся в размерах и приобретавшие сливной характер с образованием пузырей с серозно-геморрагическим содержимым (Рис. 12.1), а сам отёк распространился на левую половину груди, живота, спины и поясничной области. Отмечен жидкий стул с кровью. Добавлен цефтриаксон (2 г 2 раза в сутки). В часу дня состояние резко ухудшилось, появились боль в животе и его вздутие, стул стал дётеобразным. По всему телу появилась мелкопятнистая геморрагическая сыпь, а слева на боковой поверхности грудины – пузыри с геморрагическим содержимым до 10 см в диаметре.

Пациент был срочно переведён в хирургическое отделение. Живот в акте дыхания участвует ограниченно, вздут (больше в эпигастрии), резко болезнен и напряжён. Перистальтика кишечника не прослушивается, газы не отходят; симптом Блюмберга¹ положительный, что свидетельствует о вовлечении брюшины в воспалительный процесс. В результате проведения верхне-срединной лапаротомии из брюшной полости измилось около 600 мл жёлтой геморрагической жидкости и ещё удалено около 1,5 л. От связки Трейтца (подвешивает двенадцатиперстную кишку) до илеоцекального угла (т. е. места, где подвздошная кишка соединяется со слепой кишкой) в тонкой кишке обнаружено 16 инфильтратов плотной консистенции, синюшного цвета, от 1,5 до 4 см в диаметре. Диагностической энтеротомией в области расположения трёх крупных инфильтратов обнаружены язвы овальной формы

¹ Впервые описан германским (прусским) хирургом Якобом Морицем Блюмбергом (1873–1955); однако поскольку российский врач, акушер Дмитрий Сергеевич Щёткин (1851–1923) в сообщении, опубликованном спустя год, сообщил, что использует эту методику уже 30 лет, симптом также иногда именуют *симптомом Щёткина – Блюмберга*. Методика: во время пальпации области живота медленно надавливают на переднюю брюшную стенку, после чего резко отпускают, что приводит к резкому усилению боли или изменению её характера.

(0,5–1,5 см) с белесоватым содержимым. Лимфатические узлы брыжейки, печень и селезёнка увеличены. Поскольку зашивание кишки может привести к стенозу, выполнена резекция данного участка.

Через два дня восстановилась перистальтика кишечника, однако на следующий день развилось кишечное кровотечение: гемоглобин снизился до 68 г/л (норма 130–160 г/л), эритроциты до $1,5 \times 10^{12}/л$ (норма $4\text{--}5 \times 10^{12}/л$). В результате интенсивной терапии кровотечение остановлено. Дальнейшее течение заболевания благополучное.

На 10-й день пребывания в стационаре из крови, взятой до начала антибиотикотерапии, выделен сибиреязвенный микроб. Культура чувствительна к пенициллину, гентамицину, эритромицину, ципрофлоксацину, офлоксацину, доксициклину, цефтриаксону, слабо чувствительна к бисептолу, полимиксину.

На 20-й день лечения санировался ликвор, на 26-й день – отпали корочки, а на 66-й день – пациент выписан на амбулаторное лечение.

Данный клинический случай является уникальным, поскольку представляет не просто гематогенную и лимфогенную диссеминацию возбудителя на фоне кожной формы сибирской язвы (в частности, в головной мозг), что, как говорилось в Главе 10, уже само по себе большая редкость, но диссеминацию, приведшую к развитию кишечной формы. Конечно, можно утверждать, что обе формы развились независимо, поскольку при разделке инфицированной туши пациент мог съесть кусок сырого мяса или облизать пальцы, однако такое утверждение будет в корне неверным. Вспомним, что первые симптомы заболевания при кишечной форме проявляются гораздо раньше, чем при кожной. Однако в нашем случае «кишечные» симптомы значительно отстают во времени и, более того, развились на фоне антибиотикотерапии. Можно предположить, что как на фоне лечения бубонной формы чумы, при определённых обстоятельствах, может развиваться чумной менингит, так и в данной ситуации под действием антибиотиков возбудитель мигрировал по лимфатической системе в головной мозг (вторичный менингоэнцефалит) и кишечник (язвы тонкого кишечника и увеличенные лимфатические узлы брыжейки). Нельзя не упомянуть и о вкладе

метаболического синдрома, приводящего к снижению иммунной резистентности. Так, у пациента в анамнезе имеется сахарный диабет 2-го типа, перенесённый микроинсульт и периодическое повышение артериального давления.

Обратим также внимание, что бактериологическое подтверждение диагноза (идентификация чистой культуры) произошло на 10-й день пребывания пациента в стационаре, то есть когда уже несколько дней пациент шёл на поправку. Из Главы 10 мы помним, что генерализованная форма, развившаяся на фоне кожной, даже на фоне лечения имеет летальность 98 %, поэтому восхитимся работой эпидемиологов и инфекционистов, верно поставивших предварительный диагноз, что и спасло жизнь пациенту.

КЛИНИКА ЛЁГОЧНОЙ (ИНГАЛЯЦИОННОЙ) ФОРМЫ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ У ЧЕЛОВЕКА

2 августа 2011 года¹. 61-летний мужчина обращается в общественную больницу N на северо-западе штата Миннесота (США) после того, как в течение 2 дней у него была лихорадка, сопровождающаяся кашлем и одышкой при физической нагрузке. До этого, в период с 11 июля по 2 августа, он путешествовал с женой по паркам штатов Северная и Южная Дакота, Монтана и Вайоминг (Рис. 13.1), где супруги собирали камни и купили рога лося. Известно, что 29 июля они проезжали по пыльной дороге через стада бизонов и ослов, часто останавливаясь, когда животные окружали их автомобиль (контакта с визуально больными и мёртвыми животными не было).

¹ Sprenkle M. D., Griffith J., et al. *Lethal factor and anti-protective antigen IgG levels associated with inhalation anthrax, Minnesota, USA*. Emerg Infect Dis. 2014; 20(2):310–314; DOI: 10.3201/eid2002.130245; Griffith J., Blaney D., et al. *Investigation of inhalation anthrax case, United States*. Emerg Infect Dis. 2014; 20(2):280–283; DOI: 10.3201/eid2002.130021.

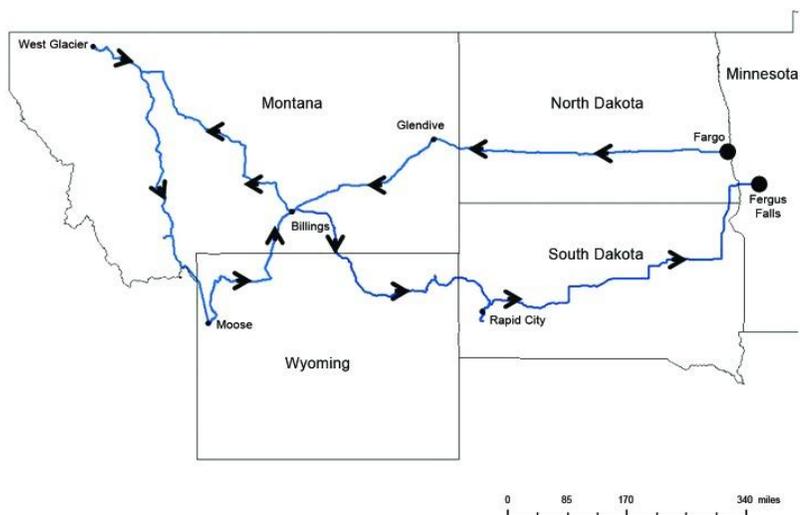


Рис. 13.1. Маршрут путешествия супружеской пары (по Griffith J., 2014)

На момент поступления артериальное давление пациента составляет 148/72 ммHg, частота сердечных сокращений 100 уд/мин, частота дыхания 20 вдохов/мин, температура 37,3 °С. Обнаружено незначительное повышение нейтрофилов (73,4 % при норме 34–70 %) и моноцитов (12,4 % при норме 4–10 %), а также снижение лимфоцитов (13,2 % при норме 20–40 %) при нормальном значении лейкоцитов ($7,6 \times 10^9/\text{л}$ при норме $4\text{--}9 \times 10^9/\text{л}$); незначительная тромбоцитопения ($132 \times 10^9/\text{л}$ при норме $180\text{--}320 \times 10^9/\text{л}$) и снижение функции печени (аланинаминотрансфераза – 92 ед/л при норме до 41 ед/л; аспартатаминотрансфераза – 43 ед/л при норме до 40 ед/л). Кроме того, анамнез отягчён многолетним химическим пневмонитом (т. е. воспалением сосудистой стенки альвеол, сопровождающимся их рубцеванием), а также сахарным диабетом, поэтому уровень глюкозы составил 13,8 ммоль/л (норма 3,9–5,5 ммоль/л).

В основании правого лёгкого наблюдается ослабленное дыхание и хрипы на верхушке, ввиду чего была проведена рентгенография грудной клетки (Рис. 13.2-А), выявившая инфильтрат в правой верхней доле и расширение средостения. Образцы крови взяты для посева, и на основании предварительного диагноза «внебольничная

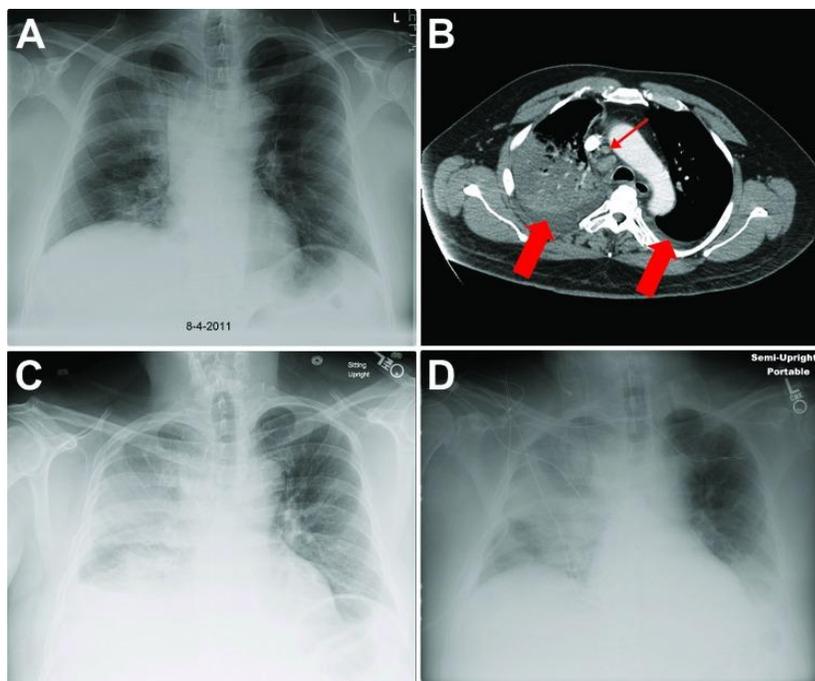


Рис. 13.2. Рентгенограммы (A, C и D) и компьютерная томография (B) органов грудной клетки на 1-й (A), 2-й (B), 4-й (C) и 6-й (D) дни госпитализации.

Маленькой стрелкой отмечена медиастинальная аденопатия, а большой – двусторонние плевральные выпоты (по Sprenkle M. D., 2014)

пневмония» начато лечение цефтриаксон (2 г) и азитромицин (500 мг) внутривенно каждые 12 часов.

На 2-й день госпитализации у пациента усилилась тахикардия и увеличилась потребность в кислороде. Компьютерная томография органов грудной клетки (Рис. 13.2-В) выявила плотную консолидацию (т. е. уплотнение) правой верхней доли, медиастинальную аденопатию (т. е. патологию внутригрудных лимфатических узлов) и двусторонние плевральные выпоты. В образцах крови обнаружено присутствие сибиреязвенного микроба, что было подтверждено Лабораторией общественного здравоохранения Департамента здравоохранения штата Миннесота (Minnesota Department of Health Public Health Laboratory). Поставлен диагноз: «ингаляционная сибирская язва». К лечению добавлен ципрофлок-

сацин (400 мг) внутривенно каждые 12 часов, а на следующий день меропенем (1 г) внутривенно каждые 8 часов и ванкомицин (2 г) внутривенно однократно.

Ввиду прогрессирования дыхательной недостаточности, инфльтрации в правом лёгком (Рис. 13.2-С) и необходимости проведения эндотрахеальной интубации на 4-й день госпитализации пациента переводят в Медицинский центр округа Хеннепин (Hennepin County Medical Center), штата Миннесота. На момент поступления пациент гемодинамически стабилен. Внутривенное введение ципрофлоксацина прекращено, добавлены клиндамицин (900 мг) внутривенно каждые 8 часов и рифампицин (300 мг) энтерально (т. е. через желудочно-кишечный тракт) каждые 12 часов.

В правую плевральную полость помещена грудная дренажная трубка (торакоцентез), и в течение суток дренировано 550 мл серозно-кровянистой жидкости, содержащей 3389 клеток/мл лейкоцитов (нейтрофилы 38 %, лимфоциты 56 %, моноциты 6 %), лактатдегидрогеназу (свидетельствует о разрушении ткани), а также выявлено отсутствие бактерий (отрицательный результат окраски по Граму). На 5-й день госпитализации дренировано 250 мл серозно-кровянистой жидкости, прекращено введение меропенема и начато экспериментальное для США лечение: введение антисибиреязвенного иммуноглобулина⁽¹⁾, после чего концентра-

¹ Ранее данный препарат Вы уже встречали в Главе 12, однако данные о концентрации антител в крови пациента отсутствуют. Известен случай в 2006 году, штат Пенсильвания (США), когда концентрация летального фактора в плазме крови и плевральной жидкости была значительно выше, а именно 294,3 нг/мл и 543,2 нг/мл соответственно (в приведённом случае концентрация составляла 58 нг/мл в сыворотке крови и 16,2 нг/мл в плевральной жидкости). Однако анти-PA IgG появились до введения препарата, что, вероятно, связано с более длительным интервалом между началом заболевания и введением препарата (10 дней против 6 дней). Пациент выжил. Вместе с тем препарат следует вводить в период продромальной стадии, поскольку более позднее введение не исключает риск смерти, как в случае 2008 года, Лондон (Великобритания), когда через 3 дня после начала терапии пациент скончался (см. Walsh J. J., Pesik N., et al. A case of naturally acquired inhalation anthrax: clinical care and analyses of anti-protective antigen immunoglobulin G and lethal factor. Clin Infect Dis. 2007; 44(7):968–971; DOI: 10.1086/512372; Anaraki S., Addiman S., et al. Investigations and control measures following a case of inhalation anthrax in East London in a drum maker and drummer, October 2008. Euro Surveill. 2008; 13(51):19076). В ряде стран препарат наряду с антибиотикотерапией является средством профилактики для контактных лиц (вводится в течение 5 дней).

ция антител против протективного антигена *V. anthracis* (анти-РА IgG) достигла максимального значения 160,5 мкг/мл и сохранялась на этом значении (Рис. 13.3).

Течение заболевания осложнилось острой почечной недостаточностью (сывороточный креатинин 132,6 мкмоль/л при норме 44–115 мкмоль/л), а на 6-й день госпитализации увеличился левый плевральный выпот (Рис. 13.2-D). На 8-й день госпитализации прекращено введение рифампицина, но возобновлён меропенем для профилактики нозокомиальной («внутрибольничной») инфекции. На 11-й день госпитализации пациент экстубирован, на 13-й день удалена грудная дренажная трубка, а к 14-му дню показатели постепенно пришли в норму, поэтому к моменту выписки, на 26-й день, антибиотикотерапия была отменена, за исключением ципрофлоксацина, который был оставлен *per os* до 60-го дня.

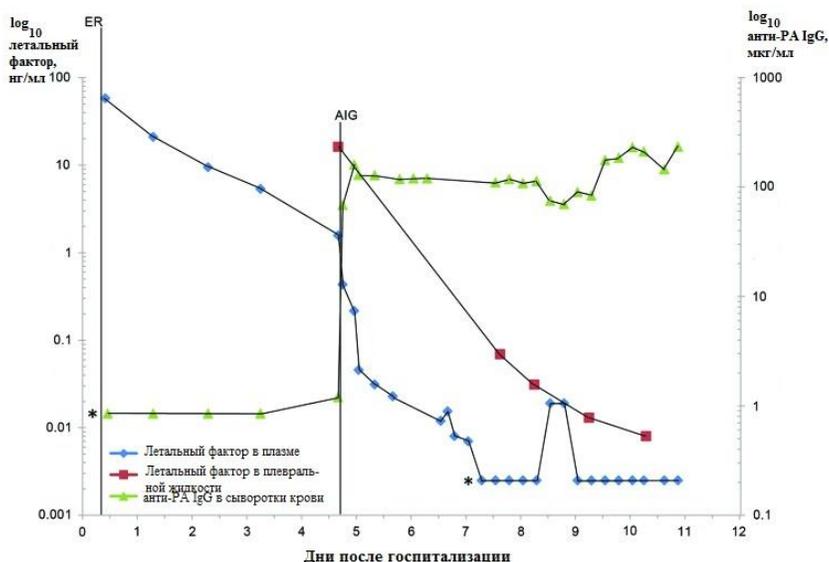


Рис. 13.3. Концентрации летального фактора в плазме и плевральной жидкости, а также анти-РА IgG в сыворотке крови. Звёздочками отмечены концентрации, выходящие за нижнюю границу количественной оценки (по Springle M. D., 2014). Обратите внимание, как первоначальная концентрация летального фактора резко снизилась после введения антисибирезявленного иммуноглобулина (AIG)

Выделенная от пациента культура *B. anthracis* типирована как GT95 и генотипически тесно связана со штаммами, выделяемыми из импортированных в страну продуктов животного происхождения. Наиболее тесно – со штаммом, являющимся этиологическим агентом случая кожной формы сибирской язвы у рабочего на желатиновой фабрике в штате Нью-Джерси (США) в 1965 году¹, где в технологическом процессе использовалась кость, импортированная из Индии. За границу пациент не выезжал в течение последнего года и не подвергался воздействию кожевенных заводов, фабрик по производству шерсти, костной муки или африканских барабанов. Он изготавливал металлические и каменные украшения и ножи с рукоятками из рогов лося в домашней мастерской, и за месяц до начала болезни сделал рыболовные мушки из волос здорового лося, на которого охотился в штате Кентукки 8 месяцев назад. Поскольку описанное происходило до поездки и явно выходит за границы инкубационного периода, встал вопрос о месте и обстоятельствах заражения (особенно учитывая предполагаемое зарубежное происхождение возбудителя). Однако имеется затруднение, связанное с тем, что выявить на основании эпидемиологического анамнеза конкретные предполагаемые места не представляется возможным, а маршрут слишком длинный, чтобы производить отбор проб по всей его длине (Рис. 13.1). Кроме того, исследование проб окружающей среды (особенно почвы) спустя три недели неэффективно. Поэтому специалисты решили ограничиться исследованием машины (47 проб), а также домашней мастерской и гаража (18 проб), что, к сожалению, не принесло результатов. Даже исследование воздушных фильтров автомобиля, которые концентрировали пыль, не выявило присутствия сибиреязвенного микроба (напомним, что пациент с женой 29 июля проезжали по пыльной дороге через стада бизонов и ослов в энзоотичном регионе², что гипотетически могло быть причиной инфицирования).

К эпидемиологическому расследованию было подключено большое количество медицинских и ветеринарных организаций, а

¹ Communicable Disease Center. Cutaneous anthrax – New Jersey. MMWR. 1965; 14:308; Bales M. E., Dannenberg A. L., et al. Epidemiologic response to anthrax outbreaks: field investigations, 1950–2001. Emerg Infect Dis. 2002; 8(10):1163–1174; DOI: 10.3201/eid0810.020223.

² То есть регионе, где регулярно происходят заболевания животных данным возбудителем.

также службы санитарного надзора штатов Северная и Южная Дакота, Миннесота, Монтана и Вайоминг (США), в том числе более 450 лабораторий, для выявления возможных вспышек сибирской язвы за период с 1 июня по 31 августа 2011 года. Вместе с тем единственный зарегистрированный в этот период случай, произошедший в августе в округе Дакота, штат Южная Дакота (США), был вызван штаммом неродственного генотипа GT3. Таким образом, несмотря на большие задействованные ресурсы, источник заражения установить не удалось, что весьма необычно для данной формы заболевания.

Поскольку единственным контактом пациента была его жена, ей был проведён курс постконтактной профилактики.

Лёгочная форма сибирской язвы встречается редко (чему способствовала вакцинация восприимчивых контингентов и животных) и чаще всего связана с вдыханием (ингализацией) спор возбудителя. Инкубационный период составляет от 3 до 6 дней, после которого начинается первая фаза заболевания, включающая гриппоподобные симптомы с лихорадкой, непродуктивным кашлем и миалгиями (т. е. мышечными болями). Отсутствие своевременного лечения приводит ко второй (молниеносной) фазе, которая обусловлена быстрой миграцией возбудителя в дендритных клетках и характеризуется гипотонией и одышкой. Эта фаза может привести к летальному исходу в течение 24 часов. Летальность при данной форме составляет 46 %.

В рамках лёгочной формы принято выделять *ингаляционную сибирскую язву*, вызываемую вдыханием и альвеолярным отложением спор возбудителя размером менее 5 мкм, из-за чего они эффективнее захватываются дендритными клетками и переносятся в лимфатические узлы средостения, где прорастают и вызывают геморрагический медиастенит (т. е. воспаление средостения). Неэффективное лечение приводит к бактериемии, токсемии и, как следствие, развитию геморрагического менингита и лептоменингита⁽¹⁾ (**Рис. 13.4**),

¹ На фоне лептоменингита (т. е. воспаления мягкой и паутинных оболочек) возможно развитие энцефалита (т. е. воспаления мозга), который сопровождается поражением сосудов головного мозга и крупными очагами геморрагической инфильтрации в веществе мозга. При выраженности данного состояния возможно

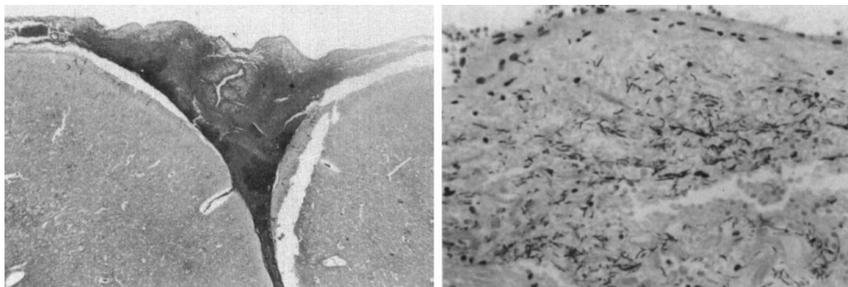


Рис. 13.4. Геморрагический лептоменингит у 29-летнего мужчины, погибшего во время аварии на военном объекте Свердловск-19 (СССР) в 1979 году: слева – ув. 15х, окраска гематоксилин-эозином; выраженная геморрагия мягкой и паутинной мозговых оболочек; справа – ув. 210х, окраска по Wright – Norris; выраженное кровоизлияние и присутствие сибиреязвенного микроба в мягкой мозговой оболочке (по Абрамова Ф. А., 1993; Copyright (1993) National Academy of Science, USA, публикуется с разрешения правообладателя)¹

септицемии и рефрактерному шоку. Поражения головного мозга имеют характерную картину, которую можно наблюдать при патологоанатомическом исследовании (**Рис. 13.5**), а именно массивные кровоизлияния в межжелудочковое пространство и мягкую мозговую оболочку, ввиду чего базальная поверхность мозга имеет тёмно-красный оттенок, именуемый *шапочка кардинала*². При гистологическом исследовании обнаруживается значительная глиальная реакция (т. е. увеличение количества глиальных клеток), большое

развитие спинального лептоменингита с меньшим поражением оболочек и выраженным отёком вещества (см. Никифоров В. Н., Бургасов С. П., и др. *Патологическая анатомия септической формы сибирской язвы (1983)*, по Никифоров В. В., Никифоров В. Н. *Сибирская язва*. Санкт-Петербург: Эко-Вектор, 2025, 527 с.).

¹ Судьба этих изображений (а также изображений на **Рис. 15.6**) поистине удивительна, поскольку все материалы, связанные со вспышкой, включая больничные записи и отчёты о вскрытии, были изъяты, представляя государственную тайну до распада СССР и юридического прекращения его существования в 1991 году. Небольшие заметки и образцы тканей удалось надёжно спрятать патологоанатому Фаине Афанасьевне Абрамовой (1921–2016) и её сотрудникам патологоанатомам Татьяне Игоревне Каза́к (1921–2005) и Льву Моисеевичу Гринбергу (р. 1953), однако представить их медицинскому сообществу они смогли лишь в 1993 году.

² Примечательно, что именно этот признак позволил патологоанатому поставить диагноз «сибирская язва» (ингаляционная форма) за сутки до выделения чистой культуры возбудителя во время вспышки заболевания, произошедшей в 1979 году во время аварии на военном объекте Свердловск-19 (СССР).



Рис. 13.5. Головной мозг, извлечённый из пациента, умершего от лёгочной формы сибирской язвы, и разделённый на секции (1966). Сравните его с **Рис. 4.1**.

количество патологически изменённых нейронов⁽¹⁾ (**Рис. 13.6**), а также нейроны с сохранной структурой, находящиеся в состоянии повышенной функциональной активности, что в совокупности указывает на инфекционно-токсическое повреждение, вызванное токсинами сибирезвенового микроба. При этом клетки возбудителя не обнаруживаются, что говорит о меньшей нейровывивности, чем в случае менин-

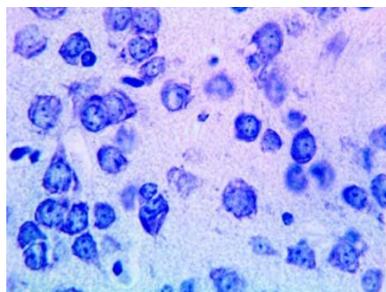


Рис. 13.6. Патологически изменённые нейроны коры головного мозга; ув. 1000х, окраска толуидиновым синим; мышинная модель, 21-е сутки (по Брюхова Д. Д., 2020)

¹ Исследования на мышинных моделях показывают, что к 21-м суткам количество глиальных клеток увеличивается с 3,2 до 4,4 кл/нейрон в случае бесплазмидных штаммов и до 4,7 кл/нейрон в случае одноплазмидного штамма (pXO1⁺), тогда как средние размеры ядер нейронов сокращаются с 46,5 до 38,5 и 33,3 мкм² соответственно (см. Брюхова Д. Д., Дубровина В. И., и др. *Патологоанатомическая картина поражения головного мозга у белых мышей при экспериментальной сибирезвеновой инфекции*. Acta Biomedica Scientifica. 2020; 5(1):65–71; DOI: 10.29413/ABS.2020–5.1.9).

гоэнцефалита на фоне кожной формы (Глава 10) и штаммов Vsbva (Глава 4).

Раннее распознавание ингаляционной сибирской язвы играет ключевую роль в благоприятности исхода, поэтому в качестве клинических признаков, позволяющих отличить ингаляционную сибирскую язву от других острых респираторных заболеваний (в частности, внебольничной пневмонии), были предложены^{<1>}:

- повышение аланинаминотрансферазы или аспартатаминотрансферазы;
- нормальное количество лейкоцитов;
- тахикардия;
- низкий уровень натрия в сыворотке;
- тошнота или рвота.

Можно видеть, что у пациента из описанного случая имеются первые три признака. В качестве ещё одного признака некоторые специалисты выделяют расширение средостения (также было у пациента), но ему следует доверять с осторожностью, поскольку он встречается у 8 % пациентов с внебольничной пневмонией. С другой стороны, популяционные исследования показывают, что у 48 % пациентов возможен лейкоцитоз^{<2>}.

3 апреля 2000 года^{<3>}, Осло, Норвегия. 49-летний мужчина обращается в клинику N с жалобами на четырёхдневную боль в ягодице, на которой обнаружена эритема (т. е. покраснение, вызван-

¹ Kuehnert M. J., Doyle T. J., et al. *Clinical features that discriminate inhalational anthrax from other acute respiratory illnesses.* Clin Infect Dis. 2003; 36(3):328–336; DOI: 10.1086/346035.

² Hendriks K., Person M. K., et al. *Clinical features of patients hospitalized for all routes of Anthrax, 1880–2018: a systematic review.* Clin Infect Dis. 2022; 75:341–353; DOI: 10.1093/cid/ciac534.

³ Ringertz S. H., Høiby E. A., et al. *Injective anthrax in a heroin skin-popper.* Lancet. 2000; 356(9241):1574–1575; DOI: 10.1016/s0140–6736(00)03133–0.

ное сильным притоком крови к капиллярам) и пальпируется болезненный подкожный инфильтрат размером 5 x 5 см. Папул или струпа, а также гноя при разрезе не обнаружено. Назначено лечение диклоксациллином.

7 апреля пациента доставляют в больницу в состоянии комы и сердечно-сосудистого шока (находится на искусственной вентиляции лёгких) на фоне инфекции мягких тканей правой ягодицы. Температура 36 °С. Обнаружены лейкоцитоз ($25,6 \times 10^9/\text{л}$ при норме $4\text{--}9 \times 10^9/\text{л}$) и значительное повышение уровня С-реактивного белка (51 мг/л при норме до 5 мг/л). Компьютерная томография головы патологий не выявила. Люмбальная пункция показала кровянисто-гнойный ликвор с содержанием лейкоцитов более 5000 клеток/мкл (норма 1–8 клеток/мкл), а также высокой концентрацией белка 5–13 г/л (норма 0,15–0,5 г/л) и соотношением глюкозы ликвора к глюкозе сыворотки 0,17 (норма 0,54–0,56). Окраска мазка ликвора по Граму обнаружила присутствие крупных грамположительных вегетативных бактерий (также обнаружены в образцах инфильтрата), которые на следующий день были идентифицированы как *B. anthracis*. Сыворотка крови на ПЦР положительна на *capA* (напомним: ген оперона *capBCAD*, кодирующего синтез капсулы). Диагноз: «системная сибирская язва». Назначено лечение высокими дозами пенициллина, хлорамфеникола и дексаметазона.

К следующему дню эритема распространилась на бедро и большую часть нижней части брюшной стенки. Хирургическое исследование выявило массивный отёк мышц и подкожных тканей, но без гноя и некроза. 10 апреля диагностировано тяжёлое повреждение мозга, ввиду чего пациент вскоре умер.

Патологоанатомическое исследование выявило увеличение селезёнки с мягкой поверхностью, а также присутствие крови в подвздошной и толстой кишке, но без геморрагических очагов. Мозг опухший, с присутствием гноя и крови в оболочках. Геморрагических поражений иных внутренних органов, включая лимфатические узлы, не выявлено.

Проведённое эпидемиологическое расследование показало, что пациент не выезжал за границу, но имел историю инъекционного употребления героина. И поскольку при жизни он утверждал, что

ни с кем не делил иголку, было выдвинуто предположение, что наркотик (или его разбавитель¹) был контаминирован спорами сибиреязвенного микроба, ввиду чего предложено именовать эту форму заболевания «инъекционная сибирская язва» (*injectional anthrax*).

С тех пор эта форма стала регистрироваться у героиновых наркоманов, употребляющих наркотик, произведённый в эндемичных районах (например, Афганистан), характеризуюсь повышенным риском развития шока и смерти по сравнению с кожной формой, несмотря на проводимую антибиотикотерапию (34 % против <1% соответственно). Считается, что инъецированные с героином подкожно или внутримышечно споры прорастают в месте инвазии и за счёт капсулы распространяются местно, вызывая значительный отёк (Рис. 14.1), но без папулы или струпа, как у кожной формы, который затем «переходит» в поражение кожи и мягких тканей (Рис. 14.2). На хирургическом исследовании выявляются значительный отёк тканей, диффузное капиллярное кровотечение и некроз поверхностной жировой ткани, но без гноя, как у абсцессов, и без



Рис. 14.1. Эритема с отёком левой молочной железы у мужчины из Германии (по Grunow R., 2012; публикуется по лицензии Deutscher Ärzteverlag GmbH; разрешение передано через the Copyright Clearance Center, Inc.)

поражения более глубоких мягких тканей с макрососудистым тромбозом и мутной жидкостью, как при некротизирующем фасците (Рис. 14.3). Иссечение поражённых тканей необходимо для снижения степени токсической нагрузки и предотвращения дальнейшего распространения возбудителя (Рис. 14.4).

¹ Обычно героин разбавляют до его попадания к потребителю, причем сухой разбавитель чаще всего содержит бактериальные загрязнители, в частности, споры представителей рода *Bacillus*.



Рис. 14.2. Язва правого плеча (слева), а также поражения кожи и мягких тканей бедра и подколенной ямки (слева) в месте инъекций героином у мужчины из Германии (по Grunow R., 2012; публикуется по лицензии Deutscher Ärzteverlag GmbH; разрешение передано через the Copyright Clearance Center, Inc.)

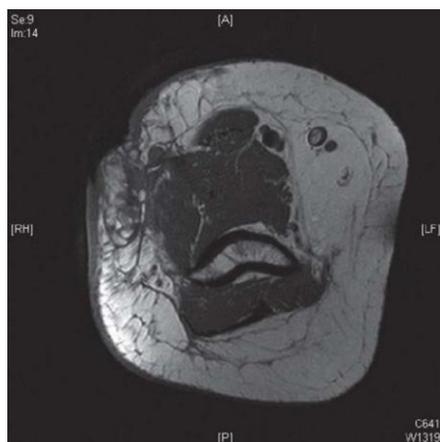


Рис. 14.3. Магнитная резонансная томография правого плеча перед хирургической обработкой у мужчины из Германии, на которой можно видеть воспаление подкожной клетчатки, но без признаков распространения воспаления на мышцы или костные структуры (по Grunow R., 2012; публикуется по лицензии Deutscher Ärzteverlag GmbH; разрешение передано через the Copyright Clearance Center, Inc.)

Клиническая картина в случае внутривенного введения характеризуется **отсутствием** абсцессов и некроза тканей, однако сообщается¹, что в брюшной полости скапливается значительное количество прозрачной, густой, похожей на слизь жидкости, содержащей гной и бактерии, которая на ультразвуковом исследовании может быть ошибочно принята за утолщение брюшины, а на компьютерной томографии – за псевдомиксому брюшины (т. е. состояние, при котором в брюшной

¹ Johns N., Cooper D., et al. *An unusual case of peritonitis in an intravenous drug user.* Gastroenterology. 2011; 141(2):435–436, 780–781; DOI: 10.1053/j.gastro.2011.02.076; Russell L., Pedersen M., et al. *Two anthrax cases with soft tissue infection, severe oedema and sepsis in Danish heroin users.* BMC Infect Dis. 2013; 13:408; DOI: 10.1186/1471-2334-13-408.



Рис. 14.4. Хирургическое иссечение некротических тканей у 30-летнего мужчины (слева) из Шотландии и у женщины (справа) из Германии (слева по Abbara A., 2014; справа по Grunow R., 2012; публикуется по лицензии Deutscher Ärzteverlag GmbH; разрешение передано через the Copyright Clearance Center, Inc.)

полости скапливается секрет, производимый раковыми клетками). Поэтому правильно собранный эпидемиологический анамнез играет первостепенную роль в постановке верного диагноза. Тонкая кишка обычно без патологий, но брыжейки тонкой и толстой кишки отёчные и также заполнены слизеподобной жидкостью (Рис. 14.5). Системное распространение возбудителя приводит к развитию септического шока.

Вместе с тем известен случай¹, когда инъекционная сибирская язва при внутривенном введении героина сопровождалась тёплыми эриматозными хроническими синусами в обеих паховых областях, а из левой выделялся зловонный гной (Рис. 14.6), что является следствием продолжительного введения наркотика в эту область. На компьютерной томографии живота, таза и бёдер обнаружена локализованная жидкость и воспалительные изменения спереди от левой поясничной мышцы, простирающиеся вниз до подвздошной кости, а также отёчность гребенчатой мышцы и большой приводящей мышцы (Рис. 14.7), но без абсцессов, некрозов и скопления жидкости в брюшной полости. Септический шок отсутствовал, и после 14 дней антибиотикотерапии (ванкомицин, ципрофлоксацин, клиндамицин) пациент был выписан на четырёхнедельный

¹ Powell A. G. M. T., Crozier J. E. M., et al. *A case of septicaemic anthrax in an intravenous drug user.* BMC Infect Dis. 2011; 11:21; DOI: 10.1186/1471-2334-11-21.

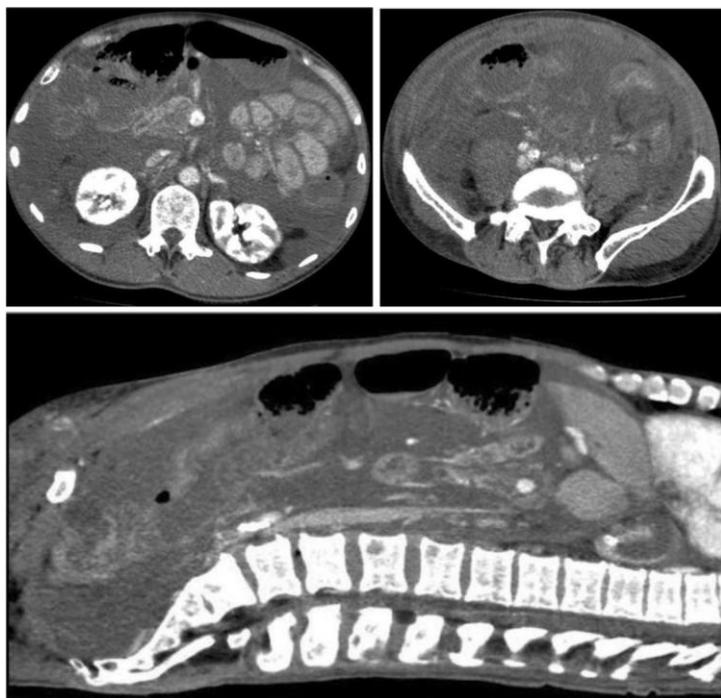


Рис. 14.5. Компьютерная томография брюшной полости в поперечной (верхнее левое) и сагиттальной (нижнее) проекциях, а также в поперечной проекции на уровне таза (верхнее правое) у 55-летнего мужчины из Дании. Можно видеть плотные слизистые массы, заполняющие брюшную полость, без признаков непроходимости кишечника или перфорации. При этом на уровне таза резко отёчная брюшина и брыжейка заполняют брюшную полость. Данное образование первоначально было интерпретировано как псевдомиксома брюшины, однако история введения героина в правую бедренную вену позволила заподозрить и подтвердить инъекционную сибирскую язву. Данный случай инъекционной сибирской язвы является первым, произошедшим в Дании (по Russel L., 2013)



Рис. 14.5. Внешний вид раны у 32-летнего мужчины из Шотландии (по Powell A.G.M.T., 2011)



Рис. 14.6. Компьютерная томография брюшной полости и таза 32-летнего мужчины из Шотландии, на которой обнаруживается локализованная жидкость и воспалительные изменения спереди от левой поясничной мышцы (верхнее), а также отёчность большой приводящей мышцы (нижнее). Обратите внимание на отсутствие характерного для инъекционной формы скопления жидкости в брюшной полости (по Rowell A. G. M. T., 2011)

курс ципрофлоксацина (400 мг) per os, после которого рана уменьшилась на 77 %. Наблюдение продолжено в амбулаторных условиях.

Этот случай наглядно показывает вариативность течения и клинических проявлений при «неприродной» форме заражения.

15

АТИПИЧНЫЕ СИМПТОМЫ И «ИСКУССТВЕННАЯ» ЭПИДЕМИОЛОГИЯ

Спустя неделю после трагических событий сентября 2001 года, вошедших в историю под названием «9/11», когда в результате террористического акта обрушились башни-близнецы Всемирного торгового центра в Нью-Йорке (США), погребя под собой 2977 человек, несколько новостных агентств получили странные письма, содержащие сведения о том, что получившим их сотрудникам следует принимать пенициллин (**Рис. 15.1**).

2 октября¹, штат Флорида. 63-летний Роберт Стивенс, фоторедактор из таблоида *Sun*, один из тех, кто держал в руках такое письмо, проснулся рано утром с тошнотой, рвотой и спутанностью сознания, ввиду чего был доставлен в местное отделение скорой помощи для обследования. Его болезнь, начавшаяся ещё 27 сентября во время поездки в штат Северная Каролина, характеризовалась недомоганием, усталостью, лихорадкой, ознобом, анорексией и потоотделением. Головная боль, кашель, боли в груди, миалгии, одышка, боли в животе, диарея или поражения кожи отсутствовали. В анамнезе гипертензия, сердечно-сосудистые заболевания и подагра. Пациент не курит. При поступлении находится в сознании и общается, но говорит бессмысленно. Температура 39,2 °С, частота сердечных сокращений 109 ударов/мин. Артериальное давление и частота дыхания в норме. Первичные лёгочные,

¹ Jernigan J. A., Stephens D. S., et al. *Bioterrorism-related inhalational anthrax: the first 10 cases reported in the United States*. Emerg Infect Dis. 2001; 7(6):933–944; DOI: 10.3201/eid0706.010604.

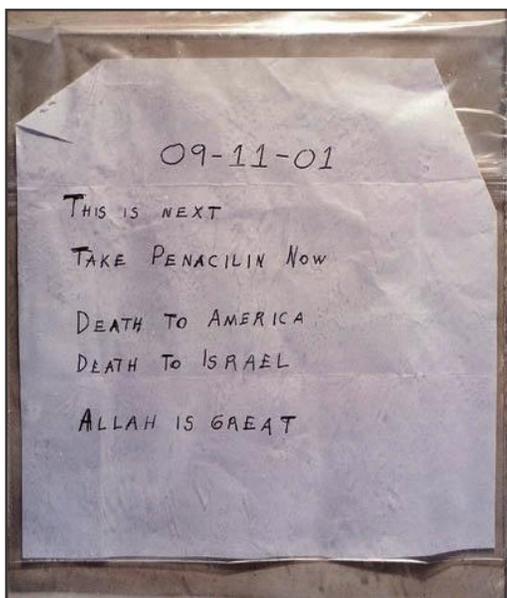


Рис. 15.1.

Одно из странных писем:

09 – 10 – 01

Это следующее

Принимайте Пенацил-
лин Теперь

Смерть Америке

Смерть Израилю

АЛЛАХ ВЕЛИК

(Обратите внимание,
что в слове «пеницил-
лин» допущена ошиб-
ка)

сердечные и брюшные обследования патологии не выявили. Ригидности (т. е. твёрдости) затылочных мышц не наблюдается. Пациент не ориентирован на человека, место или время.

Обнаружены тромбоцитопения ($109 \times 10^9/\text{л}$ при норме $180\text{--}320 \times 10^9/\text{л}$) и повышение концентрации общего билирубина ($25,65 \text{ мкмоль/л}$ при норме $5\text{--}21 \text{ мкмоль/л}$). На рентгенограмме грудной клетки имеются выступающее верхнее средостение и, вероятно, небольшой левый плевральный выпот (Рис. 15.2). В ликворе выявлено содержание лейкоцитов 4750 клеток/мкл (норма $1\text{--}8 \text{ клеток/мкл}$), характеризующееся 80% нейтрофилов, а также эритроциты 1375 клеток/мл (в норме отсутствуют), высокая концентрация белка $6,66 \text{ г/л}$ (норма $0,15\text{--}0,5 \text{ г/л}$) и соотношение глюкозы ликвора к глюкозе сыворотки $0,32$ (норма $0,54\text{--}0,56$). Окраска мазка ликвора по Граму показала присутствие крупных грамположительных вегетативных бактерий (Рис. 15.3), которые через 7 часов были идентифицированы как *B. anthracis*. На следующие сутки аналогичный результат был получен из образцов крови. Поставлен диагноз «менингит», который развился на фоне лёгочной формы сибирской язвы.

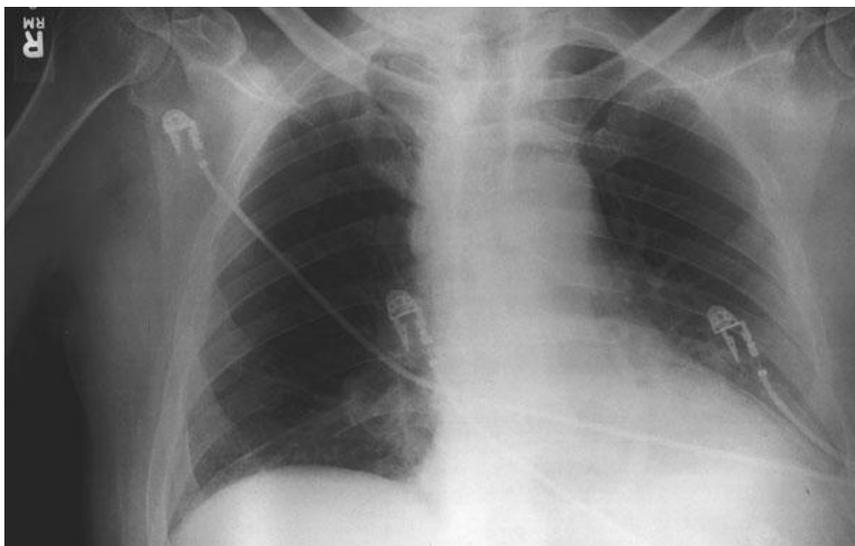


Рис. 15.2. Рентгенограмма грудной клетки 63-летнего мужчины, демонстрирующая выступающее верхнее средостение (по Jernigan J. A., 2001)

После однократной дозы цефотаксима назначено несколько антибиотиков, включая цефтазидим, гентамицин, метронидазол, доксициклин, ампициллин и триметоприм-сульфаметоксазол. Через некоторое время развились генерализованные судороги, ввиду чего пациента интубировали для защиты дыхательных путей.

Через два дня начаты пенициллин G, левофлоксацин и клиндамицин; ампициллин, цефтазидим и триметоприм-сульфаметоксазол прекращены. Лихорадка сохранилась, и пациент перестал реагировать на глубокие раздражители. Состояние постепенно ухудшалось, развилась гипотония и почечная недостаточность. Смерть наступила 5 октября.

На патологоанатомическом исследовании обнаружены геморрагический медиастинальный лимфаденит, а также присутствие сибиреязвенного микроба в нескольких органах.

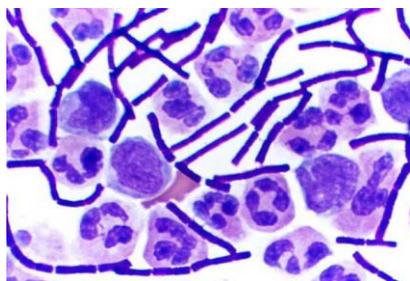


Рис. 15.3. Окраска ликвора по Граму (по Jernigan J. A., 2001)

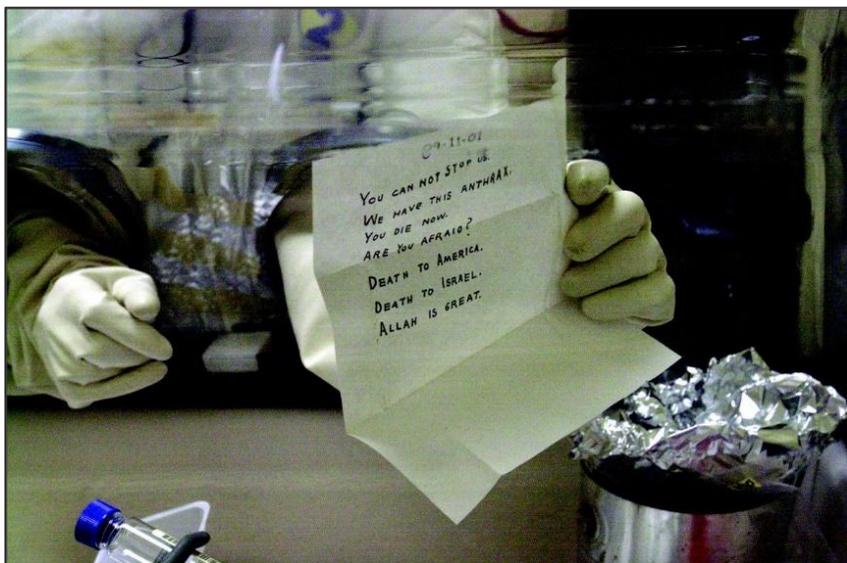


Рис. 15.4. Письмо, отправленное в офис сенатора Патрика Лихи

Злополучное письмо обнаружить не удалось, однако письма, отправленные в другие новостные агентства, в частности, New York Post и NBC News, датированные по штемпелю 18 сентября, содержали комковатый коричневый материал, похожий на собачий корм. Похожие письма, но уже содержащие мелкий порошок и датированные по штемпелю 9 октября, были отправлены сенаторам Томасу Дэшлу и Патрику Лихи. Помощники первого вскрыли письмо, а второе было изъято специалистами ещё на почте, поскольку почтальон неправильно прочитал почтовый индекс (Рис. 15.4). Все они содержали споры сибирской язвы.

До этого события лёгочная форма сибирской язвы в США регистрировалась только в 1976 году¹, но после, в период с 4 октября по 2 ноября, произошёл ещё по меньшей мере 21 случай заражения в округе Колумбия, Флориде, Нью-Джерси и Нью-Йорке. В результате эпидемиологического расследования было выдвинуто предположение о том, что вспышка вызвана преднамеренной доставкой спор *B. anthracis* через странные письма, имевшие почтовый

¹ Suffin S. C., Carnes W. H., et al. *Inhalation anthrax in a home craftsman*. Hum Pathol. 1978; 9(5):594–597; DOI: 10.1016/s0046–8177(78)80140–3.

штемпель города Трентон, столицы штата Нью-Джерси, поскольку только они «связывали» всех инфицированных. Кроме того, в почтовом ящике, установленном по адресу «Nassau street, 10», также присутствовали споры сибирской язвы, что указывало на отправку писем из Принстона, штат Нью-Джерси (оттуда они попадали в Трентон, где и проставлялся штемпель).

В результате данного события, получившего название Amerithrax (от America и anthrax), погибло 5 человек, включая Роберта Стівенса, ставшего первой жертвой. Для всех инфицированных инкубационный период составил 4 дня, после чего у 11 пострадавших развились симптомы кожной формы сибирской язвы (все вылечены), а у 11 пострадавших – лёгочной (ингаляционной). При этом двадцать человек были работниками почтовой службы либо контактировали с местами, где сортировалась, обрабатывалась или получалась почта. Кроме того, ещё у 31 человека имелись антитела, свидетельствующие о воздействии спор сибиреязвенного микроба без развития клинических проявлений.

Клиническое течение кожной формы мало чем отличается от описанного ранее, а вот о лёгочной (ингаляционной) следует поговорить подробнее. При обращении в лечебные учреждения у всех пациентов обнаруживались лихорадка или озноб, усталость или недомогание, у 70 % – потливость, у 90 % – незначительный кашель, у 80 % – одышка, у 90 % – тошнота или рвота. Количество лейкоцитов находилось в диапазоне от $7,5 \times 10^9/\text{л}$ до $13,3 \times 10^9/\text{л}$, но в 80 % случаев выше нормы и часто с повышенным содержанием нейтрофилов и палочкоядерных форм, а уровень натрия располагался на нижней границе нормы, что, как мы помним из Главы 13, не характерно для данной формы. Более того, в 70 % случаев имелись аномальные рентгенограммы грудной клетки, на которых обнаруживались широкое средостение и инфильтраты (**Рис. 15.2** и **Рис.15.5**). Однако на компьютерной томографии чётко визуализировалась лимфаденопатия средостения, а у погибших – лимфаденит средостения (**Рис. 15.6**), что соответствует картине ингаляционной сибирской язвы, поэтому в данной истории компьютерная томография оказалась информативнее.

Наиболее интересным и противоречивым оказалось наличие у двух жертв (оба исхода летальные) клинических проявлений желу-

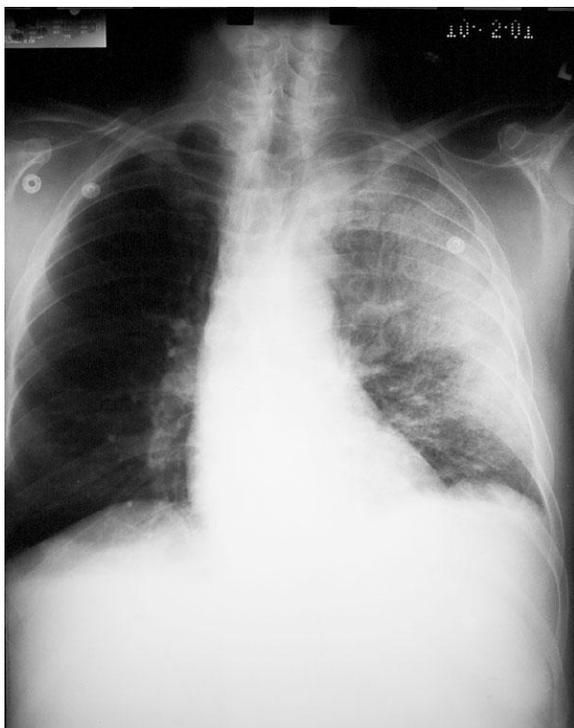
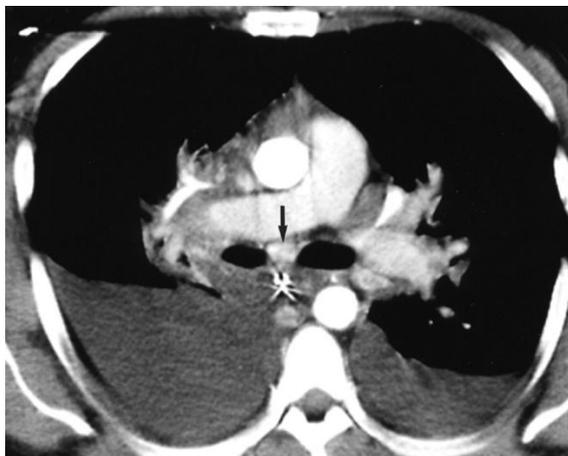


Рис. 15.5. Рентгенограмма грудной клетки 73-летнего мужчины-почтальона, доставившего письмо Роберту Стивенсу, демонстрирующая инфильтраты в левой верхней и нижней доле, а также незначительный плевральный выпот. Признаки расширения средостения отсутствуют, хотя были обнаружены на последующих рентгенограммах. Симптомы заболевания начались 24 сентября, но в результате лечения пациент пошёл на поправку и был выписан 23 октября (по Jernigan J. A., 2001)

Рис. 15.6. Контрастная компьютерная томография с настройками медиастинального окна грудной клетки 47-летнего мужчины с ингаляционной формой сибирской язвы, демонстрирующая высокую степень затухания субкаринальных лимфатических узлов (стрелка), что указывает на



геморрагический лимфаденит (по Wood B. J., et al. 2003; Copyright© 2003 American Roentgen Ray Society, публикуется по лицензии правообладателя)

дочно-кишечной формы, а именно асцита, воздуха в системе воротной вены, отека брыжейки, диффузного отёка тонкой кишки и небольших скоплений воздуха в кистах, охватывающих несколько частей тощей кишки (интрамуральный пневматоз). При госпитализации они жаловались на боль в животе, а на вскрытии в тонком кишечнике был обнаружен сибиреязвенный микроб. Вместе с тем изъязвления кишечника, поражения его слизистой оболочки и регионарный лимфаденит – главные свидетельства инвазии через желудочно-кишечный тракт – отсутствовали! Вполне вероятно, что развитие кишечной формы стало результатом гематогенного распространения, а не проглатывания спор, как в случае из Главы 11. Примечательно, что во время вспышки ингаляционной сибирской язвы в 1979 году¹, когда на военном объекте Свердловск-19 (СССР) был снят защитный фильтр без внесения сведений в журнал, ввиду чего миллионы спор во время работы смены устремились в воздух², в 93 % случаев³ также имели место поражения желудочно-кишечного тракта, что стало следствием многоочагового гематогенного распространения возбудителя в подслизистую оболочку желудка, тонкой и толстой кишки (**Рис. 15.7**). При этом, как и в нашем случае, поражения не затрагивали пейеровы бляшки, а геморраги-

¹ Abramova F. A., Grinberg L. M., et al. *Pathology of inhalational anthrax in 42 cases from the Sverdlovsk outbreak of 1979*. PNAS. 1993; 90(6):2291–2294; DOI: 10.1073/pnas.90.6.2291; Абрамова Ф. А., Гринберг Л. М. *Патологическая анатомия сибиреязвенного сепсиса по материалам инфекционной вспышки 1979 г. в Свердловске (некоторые вопросы морфо-пато- и танатогенеза)*. Архив патологии. 1993; 1:23–26.

² Данное событие является классическим примером так называемой *модели швейцарского сыра* (англ. Swiss cheese model), применяемой при управлении рисками, согласно которой между угрозой и происшествием лежит много уровней защиты (ломтики сыра). И подобно тому, как на каждом ломтике сыра имеются отверстия («глазки»), так и на каждом уровне защиты могут быть изъяны, которые сами по себе не приводят к происшествиям (они только аварийные ситуации), но их наложение друг на друга может привести к нему. Применительно к упомянутой ситуации само по себе отсутствие записи в журнале не привело к аварии, к ней привела череда ошибок, включающая как отсутствие записи в журнале, так и то, что работающая смена не проверила наличия фильтров.

³ Необходимо оговориться, что статистика приводится в расчёте на 42 погибших, сведения о патологоанатомическом исследовании которых стали доступны благодаря сохранённым записям патологоанатома Фаины Афанасьевны Абрамовой и её коллег. Однако официально известно о 64 погибших, хотя по некоторым сведениям их может быть до 500 человек, поскольку помимо Свердловска (ныне Екатеринбург, Россия) инфицирования регистрировались ещё в 26 населённых пунктах по направлению к Челябинску, куда споры сибирской язвы гнал ветер.

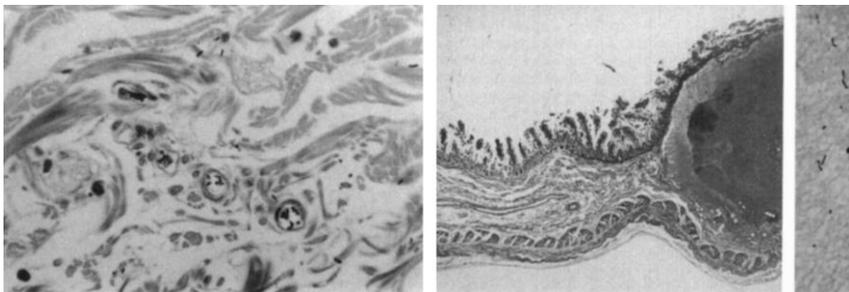


Рис. 15.7. Поражение кишечника у 68-летнего мужчины, погибшего во время аварии на военном объекте Свердловск-19 (СССР) в 1979 году: слева – ув. 300х, окраска по Вроули – Норрпс; присутствие сибиреязвенного микроба в мелких сосудах подслизистой оболочки кишечника; посередине – ув. 300х, окраска гематоксилин-эозином; очаг кровоизлияния в подслизистой оболочке тонкого кишечника, распространяющийся на собственную мышцу, при сохранении вышележащей слизистой оболочки; справа – ув. 250х, окраска по Вроули – Норрпс; присутствие сибиреязвенного микроба в области кровоизлияния (по Авратова Ф. А., 1993; Sor-yright (1993) National Academy of Science, USA, публикуется с разрешения правообладателя)

ческое поражение мезентериальных (т. е. расположенных на местах крепления кишечника к брыжейке) лимфатических узлов имело только в 21 % случаев.

Выделенная от Роберта Стивенса культура была секвенирована к концу 2001 года¹. Она оказалась производной от штамма Ames, выделенного в 1981 году² от 14-месячной коровы породы бифмастер в Сарите, штат Техас (США). Исследование культур, выделенных из конвертов, также подтвердило их принадлежность к штамму Ames, однако дальнейшее культивирование на питательной

¹ Read T. D., Salzberg S. L., et al. *Comparative genome sequencing for discovery of novel polymorphisms in Bacillus anthracis*. Science. 2002; 296(5575):2028–2033; DOI: 10.1126/science.1071837.

² Назван ошибочно в честь города Эймс (Ames), штат Айова (США). Дело в том, что сотрудники Техасской ветеринарной медико-диагностической лаборатории (Texas A&M Veterinary Medical Diagnostic Laboratory), выделив штамм, отправили его в Медицинский НИИ инфекционных болезней Армии США (United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases; USAMRIID) в конверте, содержащем на обратной стороне адрес «USDA's National Veterinary Services Laboratories in Ames» (Национальная ветеринарная лаборатория Министерства сельского хозяйства США в Эймсе), ввиду чего принимающая сторона ошибочно посчитала, что штамм прибыл из Эймса.

среде показало интересную особенность: они формировали колонии четырёх морфотипов, отличные от колоний «классического» штамма, формирующего серовато-белые компактные колонии с характерной «гривой льва» по краю (**Рис. 15.8**). *Морфотип А* характеризовался крупными желтовато-серыми «растекающимися» колониями типа «бычий глаз». В геноме штаммов, его формирующих, обнаружили повтор размером 2023 п. н. в последовательности LL10, а также однонуклеотидный полиморфизм (замена гуанина на тимин; пишут: G→T) в позиции¹ 3837162 гена GBAА_4191, кодирующего синтез белка поглощения калия семейства TrkA. *Морфотип В* характеризовался крупными жёлтыми «растекающимися» колониями. В геноме штаммов, его формирующих, обнаружили однонуклеотидный полиморфизм (T→C) в позиции 5065092 в области между геном GBAА_5581, кодирующим синтез белка споруляции F стадии 0 (*spo0F*), и геном GBAА_5582. *Морфотип C/D* характеризовался серовато-жёлтыми несколько «растекающимися» колониями. В геноме штаммов, его формирующих, обнаружили однонуклеотидный полиморфизм (TGG→TAG) в позиции 2139247 гена GBAА_2291, кодирующего синтез сенсорной гистидинкиназы, что предотвращает её синтез. *Морфотип E* характеризовался желтоватыми компактными колониями. В геноме штаммов, его формирующих, обнаружили делецию 21 п. н. в гене, расположенном на плазмиде pXO1. Всё это способствовало разработке генетических маркеров с исключительной специфичностью для штаммов, вызвавших Amerithrax², чтобы с помощью ПЦР отличать их от других штаммов сибиреязвенного микроба, чей геном, как мы помним, достаточно мономорфен. Конечно, можно было бы секвенировать каждую выделенную культуру (как преимущественно делают сейчас), но в то время это было ещё очень сложно и дорого. В итоге исследование культур, выделенных от остальных инфицированных, а также из 1070 проб окружающей среды, подтвердило их общий источник и первоначальную гипотезу о преднамеренном заражении через письма.

¹ Здесь и далее позиция определена по геному «классического» штамма Ames.

² Rasko D. A., Worsham P. L., et al. *Bacillus anthracis comparative genome analysis in support of the Amerithrax investigation*. PNAS. 2011; 108(12):5027–5032; DOI: 10.1073/pnas.1016657108.

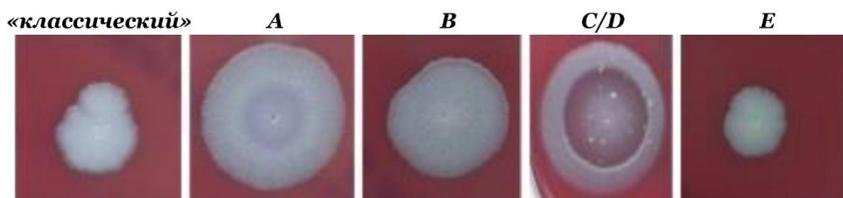


Рис. 15.8. Морфотипы колоний изолятов, вызвавших Amerithrax, в сравнении с «классическим» штаммом Ames (по Rasko D. A., 2011; публикуется с разрешения the National Academy of Science, USA)

Далее встал вопрос: кто и зачем это сделал? Первоначальное подозрение пало на «исламистских» террористов, подкрепляемое текстом из писем и эмоциями на фоне событий 9/11. И действительно, несмотря на то, что штамм Ames, использовавшийся для создания вакцин, имелся только в лабораториях США, Великобритании и Канады, в произошедших событиях сразу же обвинили террористов «Аль-Каиды», у которых якобы имеются лаборатории на территории Ирака, занимающиеся разработкой биологического оружия, что стало одной из причин вторжения в Ирак, приведшего к гибели более миллиона мирных жителей. Конечно же, никакого биологического оружия и сибиреязвенного микроба там обнаружено не было, но нужно понимать, что такие слова, как «биологическое оружие» и «биолaborатории» являются прекрасным орудием в информационной войне, поскольку апеллируют к страху. Тем не менее длительное расследование, затянувшееся до начала 2010 года, объявило преступником Брюса Айвинса¹, поскольку в его лаборатории в Медицинском НИИ инфекционных болезней Армии США (где штамм и получил своё название) был обнаружен флакон с сибиреязвенным микробом, идентифицированным как штамм Ames. Однако Айвинс, до 10 июля 2008 года проходивший консультантом по этому делу, имел психические расстройства и уже 29 июля (до официального обвинения) умер в результате самоубийства с помощью передозировки парацетамолом. В 2011 году его причастность будет поставлена под сомнение, поскольку происхождение штаммов, вызвавших Amerithrax, от штаммов из лабора-

¹ Bruce Edwards Ivins, 1946–2008; американский микробиолог. Автор работ по биобезопасности, создатель сибиреязвенной вакцины.

тории Айвинса не доказана¹. Таким образом, достоверного ответа на вопрос «кто и зачем» до настоящего времени нет.

Тем не менее эта история весьма наглядно демонстрирует, что даже в нашем тысячелетии имеются силы, способные использовать биологические агенты в качестве оружия, несмотря на его неуправляемость, и которые не боятся быть обнаруженными. Исторически биологическое оружие применялось во время боевых действий и в мирное время (биотерроризм). История его создания и применения уходит в древность, но пик приходится на XX век. И несмотря на *Женевский протокол 1925 года о запрещении применения на войне удушающих, ядовитых или других подобных газов и бактериологических средств*, а также *Конвенцию 1972 года о запрещении разработки, производства и накопления запасов бактериологического (биологического) и токсинного оружия*, до сих пор многими странами создаётся биологическое оружие под прикрытием разработки средств защиты от него.

Особенностью эпидемиологического процесса, вызванного применением биологического оружия, который принято называть «искусственным», является отсутствие классической триады «*возбудитель – переносчик – восприимчивый организм*», поскольку в роли переносчика выступают различные технологические («искусственные») средства доставки возбудителя до восприимчивого организма, которым в данном случае является конкретный человек или население (военное формирование, жители города). Поэтому воздействие на одно из звеньев триады не представляется возможным в принципе, за исключением того случая, когда об акте применения биологического оружия известно заранее.

В качестве возбудителя обычно выбирается патогенный биологический агент (чаще бактерия или вирус), выращивание, хранение и доставка которого возможны технически. Кроме того, он должен вызывать заболевание, быть относительно стабильным во внешней среде на период с применения до инфицирования, и его выбор зависит от ставящихся целей. Так, поскольку в случае биотерроризма целью акта является паника в густонаселённом городе, тер-

¹ *Review of the Scientific Approaches Used During the FBI's Investigation of the 2001 Anthrax Letters*, National Academies Press, 2011, 210 p.; DOI: 10.17226/13098.

рористы обычно выбирают возбудитель из числа тех, что будут воздействовать на историческую память, например, чумной микроб, при упоминании которого в голове каждого человека встают картины страшных эпидемий прошлого. Вместе с тем он достаточно прихотлив при выращивании (является ауксотрофом¹) и слабо устойчив во внешней среде. В этом смысле сибиреязвенный микроб устойчивее, однако инфицированные им люди не способны заражать других людей, поэтому при грамотной работе санитарной службы паники можно будет избежать и, соответственно, цель акта не будет достигнута. В случае военных действий целью применения биологического оружия является военное преимущество, поэтому выбирается такой возбудитель, который способен временно вывести из строя солдат противника, не нанеся вред солдатам собственных войск. Один из участников советской программы по созданию биологического наступательного оружия, Канатжан Байзакович Алибеков², сообщает³, что *«изучив один из штаммов вируса СПИДа, полученный из лаборатории США в 1985 году, мы пришли к выводу, что слишком длительный инкубационный период делает его непригодным для использования в военных целях. Нельзя же было посеять панический ужас в войсках противника, заразив их болезнью, первые признаки которой могут появиться только спустя несколько лет!»* Имеются сведения, что в качестве патогена для «военных целей» применялся туберкулезный микроб, инфицирование которым временно выводило из строя солдат противника высокой температурой (свои солда-

¹ То есть не способен синтезировать органические соединения, необходимые для роста, поэтому существование чумного микроба в природе поддерживается эпизоотиями на животных (см. Главы 4 и 5 Оперы о чуме), что невозможно в случае его применения в качестве биологического оружия.

² Канатжан Байзақұлы Әлібеков, Ken Alibek, р. 1950; советский и американский военный врач, бактериолог. Первый заместитель (1988–1992) Главного управления научно-производственного объединения «Биопрепарат» (предприятие п/я А-163) – советской секретной программы по разработке биологического оружия. В 1992 году эмигрировал в США, где опубликовал книгу о своей работе в «Биопрепарате», которая подтвердила деятельность этой организации, ранее известную только со слов бежавшего в Великобританию в 1989 году советского биолога Владимира Артёмовича Пасечника (1937–2001), бывшего директора Ленинградского института особо чистых биопрепаратов.

³ Alibek K., Handelman S. *Biohazard: the chilling true story of the largest covert Biological Weapons Program in the world – told from inside by the man who rat it*. Delta, 2000, 336 p.

ты были при этом вакцинированы), что позволяло их легко разоружить и взять в плен.

Вместе с тем необходимо помнить о возможных нежелательных последствиях, связанных со сложностями в управлении, поскольку даже применение бактерий (не говоря о вирусах!) может привести к результатам, прямо противоположным запланированным. Так, например, в 1972 году во время проведения испытаний на полигоне «Бархан», расположенном на острове Возрождения (СССР), из-за внезапно изменившего направление ветра погибло двое рыбаков, случайно оказавшихся на лодке в акватории острова. В качестве ещё одного примера упомянем британскую операцию Vegetarian (англ. «Вегетарианец»), целью которой было заражение льняного жмыха спорами сибирской язвы, что должно было привести к массовой гибели скота и людей, употребивших его мясо в пищу, в нацистской Германии во время Второй мировой войны, что также спровоцировало бы сильный дефицит продовольствия. Однако успехи на фронтах, произошедшие к дате подготовки операции, 1944 году, способствовали её отмене, правда, остров Груинард (Шотландия), на котором проходили испытания, оставался закрытым на карантин ещё полвека.

Во второй половине прошлого века государственные программы по созданию биологического оружия в разных странах начали концентрироваться на создании возбудителей с новыми свойствами, например, с устойчивостью к антибиотикам. Однако это оказалось неэффективным, поскольку, как верно подметил ещё один участник советской программы по созданию биологического оружия Игорь Валерианович Домарадский¹: «Приобретая нечто новое, микробы нередко теряют старые, не менее важные признаки»². Так,

¹ 1925–2009; советский и российский врач, бактериолог. Академик Академии медицинских наук СССР (1991). Директор Иркутского (1957–1964) и Ростовского (1964–1973) противочумных институтов. Как крупный специалист по чуме и туляремии, с 1970-х годов был привлечён к советской программе по разработке бактериологического оружия (работы по генетической модификации бактерий с целью повышения их вирулентности и антибиотикорезистентности); заместитель директора по науке во ВНИИ прикладной микробиологии (ныне – Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии). В автобиографической книге «Перевертыш» выражал раскаяние в данной работе.

² Домарадский И. В. *Перевертыш (рассказ «неудобного человека»)*. М.: [б.н.], 1995, 176 с.

например, попытки введения в чумной микроб генов устойчивости к антибиотикам, приводят к потере генов, отвечающих за вирулентность (бактерия буквально «выплёвывает» соответствующие плазмиды), ввиду чего тем же Игорем Валериановичем было предложено применять несколько не модифицированных возбудителей, из-за которых клиническая картина будет атипичной, вводящей в заблуждение клиницистов, что отсрочит верную постановку диагноза и, соответственно, лечение инфицированных и профилактику контактных. Кроме того, использование модифицированных патогенов неэффективно ещё и ввиду развития молекулярно-генетических методов исследования, позволяющих установить искусственную природу возбудителя. В случае *Amerithrax* мы видели, что именно природность возбудителя стала причиной сложности выявления виновника. И действительно, зачем изобретать что-то новое, тратить на это колоссальные ресурсы, когда природа уже это сделала? Тот же штамм чумного микроба с множественной антибиотикорезистентностью, сохранивший свои вирулентные свойства, был выделен из природного источника в Мадагаскаре в 1995 году, что указывает лишь на несовершенство наших методов модификации. Однако не стоит забывать о различных модифицирующих добавках. Так, добавление кремния к спорам сибиреязвенного микроба значительно повышает способность последнего проникать в лёгкие, поэтому его присутствие искали в письмах во время *Amerithrax*, однако, безуспешно.

Вместе с тем все штаммы, являющиеся потенциальными агентами биологического оружия, **надёжно** хранятся в государственных коллекциях (музеях) и выдаются для работы только тем учреждениям, что имеют разрешение на работу с ними, поскольку в них исключён выход возбудителя во внешнюю среду, в том числе в результате аварии. Сотрудники этих учреждений, обученные правилам безопасной работы, также получают разрешение на работу, при этом патогены, находящиеся в работе, секвенированы. Поэтому если к настоящему моменту Вам показалось, что всё легко и просто: идёшь в близлежащую лабораторию, берёшь нужный патоген и устраиваешь геноцид докучающим соседям, то придётся расстроиться – это невозможно. Однако задумайтесь об этих мыслях и о том, ту ли профессию Вы выбрали, поскольку *врач, вступая в медицинское сообщество, добровольно посвящает свою жизнь служению*

человечеству и не использует свои медицинские знания для нарушения прав человека и гражданских свобод, даже под угрозой¹.

При эпидемиологическом расследовании вспышки, вызванной применением биологического оружия, важно учитывать способ его применения. Наиболее эффективным и перспективным в военное время считается *аэрозольный* способ, поскольку он позволяет со значительного расстояния инфицировать определённую часть населения (в том числе находящуюся в негерметичных строениях), прост в реализации и высокоэффективен, поскольку «доставка» патогена возможна как с линии фронта, так и с воздуха. Существенным его недостатком является сильная зависимость от погодных условий, из-за которой может произойти заражение нецелевой территории, а также физический и биологический «распад» аэрозоля. Первый обусловлен, в частности, действием ветра и осадков (снижается количество взвешенных частиц), а второй – солнечной радиацией, температурой и влажностью воздуха (снижается количество жизнеспособных и вирулентных патогенов). Наиболее эффективным считается применение биологического аэрозоля в осенне-зимний период, когда температура воздуха находится в диапазоне от -15 до +10 °С (оптимально от 0 до +8 °С), в инверсионных (допустимо изотермических) условиях вертикальной устойчивости приземного слоя воздуха (Табл. 15.1), при средних значениях относительной влажности воздуха, скорости ветра 1,5–5 м/с, отсутствии солнечной радиации (ночь) и осадков.

На эффективность действия аэрозоля значительное влияние также оказывает рельеф местности. На открытом пространстве он будет распределяться равномерно, тогда как в случае природных или антропогенных препятствий (леса, горы, здания) увеличивается рассеивание облака, ввиду чего уменьшается площадь потенциального инфицирования (Рис. 15.9). Вместе с тем в местности, где ограничена циркуляция воздушных масс и действия прямой солнечной радиации (например, при плотной жилой застройке), возможно «застаивание» облака и оседание частиц аэрозоля на землю. Там они смешиваются с пылью и мелкими частицами грунта, которые

¹ *World Medical Association Declaration of Geneva*. Adopted by the 2nd General Assembly of the World Medical Association, Geneva, Switzerland, September 1948 (and amended).

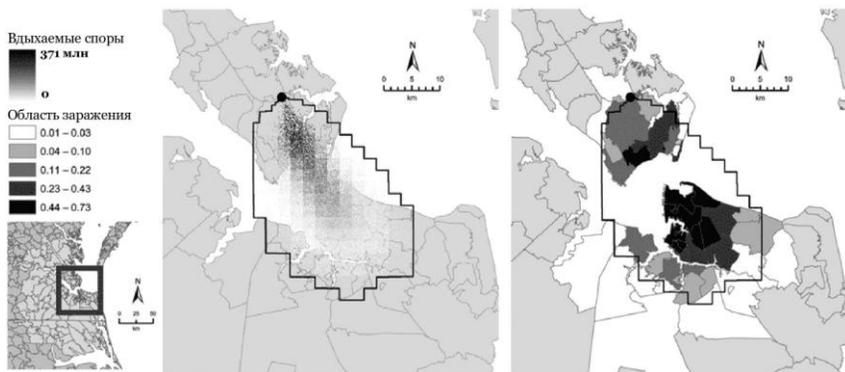


Рис. 15.9. Модель рассеивания (слева) и инфицирования (справа) территории (контур) при аэрозолировании 1 кг спор сибирской язвы с учётом рельефа местности (по Buckeridge D. L., 2006)

Табл. 15.1. Факторы, определяющие устойчивость приземного слоя воздуха

Степень вертикальной устойчивости воздуха	Температурный градиент	Восходящие потоки воздуха	Наиболее характерное		Условия применения биологического аэрозоля
			время суток	погода	
Инверсия	< 0 °С	–	ночь	ясно, малооблачно	Наиболее приемлемые
			ранее утро		
Изотермия	от –2 до +2 °С	±	ночь	облачно	Умеренно приемлемые
			день		
			утро (1 час после восхода солнца)		
			вечер (1 час после захода солнца)		
Конвекция	> 0 °С	+++	день	ясно, малооблачно	Мало приемлемые

при движении людей, транспорта или сильном порыве ветра могут подняться и вызывать *вторичное инфицирование*.

Помимо аэрозольного способа выделяют *трансмиссивный*, при котором в качестве переносчиков используются инфицированные кровососущие. Этот способ, в частности, активно применялся в прошлом веке японскими военными из отряда 731¹, однако сейчас он малоэффективен, поскольку появление значительного числа блох в каком-то городе сразу вызовет большое подозрение, а очаг будет быстро ликвидирован специалистами санитарно-эпидемиологических служб (конечно, когда речь идет о развитых странах).

Диверсионный способ, пожалуй, самый актуальный для мирного времени, поскольку позволяет скрытым образом инфицировать различные объекты внешней среды (включая продукты питания), однако он в значительной степени ограничен необходимостью ввоза возбудителя и оборудования, поэтому место «сброса» может быть весьма неудачным для террориста в смысле внешних условий для патогена. В этом случае наиболее эффективной стратегией для эпидемиолога является понимание экологии возбудителя. Представим себе ситуацию, когда диверсионная группа сбросила некоторое количество спор сибиреязвенного микроба в водный источник, питающий местный город. Вероятно, первой реакцией будет желание перекрыть поставку воды и залить источник раствором дезинфектанта, лишив тем самым жителей города воды, что, конечно же, на руку диверсантам. Однако возбудитель инфекции – это не абстрактный «X», который можно легко вынести «за скобки» проводимых мероприятий и не учитывать в работе, чем, к сожалению, грешат некоторые эпидемиологи. Возбудитель – это центральная фигура всего процесса, поэтому обратимся к экологии *B. anthracis*. Мы помним, что это почвенный микроб, для которого пребывание в воде является неблагоприятным фактором (то есть место сброса неудачное). Значительная часть спор осядет на дно, другая погибнет из-за перепадов температуры, третья будет поведе-

¹ Яп. 731 部隊; специальный отряд в составе Квантунской армии, проводивший в годы Второй мировой войны опыты на живых людях, преимущественно на китайцах и маньчжурах, в том числе направленные на разработку наступательного биологического оружия.

на водными обитателями, а четвёртая – обеззаражена в очистных сооружениях, хотя ограничить доступ к воде (особенно животных) всё же стоит. В данной ситуации также будет весьма уместно рассмотреть произошедшее путём «переноса» на известный исторический контекст, а именно вспомнить, что местоположение значительного числа сибиреязвенных захоронений (скотомогильников), потенциально содержащих в себе споры сибиреязвенного микроба, неизвестно, поэтому высока вероятность того, что многие из них были размыты при изменении русел рек, соответственно, споры так или иначе доходили до конечного потребителя воды. Однако массовых вспышек не произошло. Другой пример. Разработчик наступательного биологического оружия Ниси Сюньэй (Тосихидэ)¹ сообщает², что в Отряде 731 велись опыты по заражению сибирской язвой водоёмов «*путём распространения бактерий в сухом виде*» в районе станции Пинфан города Харбин (Маньчжурия), однако массовых вспышек также не произошло. Почему? Потому что, как и у любого другого возбудителя, для инфицирования необходимо достижение минимальной заражающей дозы, и вот именно этот показатель наиболее важен для планирования противоэпидемических мероприятий. Тут стоит сказать, что экстраполяция имеющихся знаний весьма важный инструмент в работе врача. Так, Кита́сато Сибасабу́ро³ во время ликвидации вспышки чумы в Гонконге в 1894 году, не имея возможности выделить возбудитель из трупов

¹ 西 俊英, 1904 – ?; японский военный врач, бактериолог. Начальник противоэпидемического отделения 673 в уезде Сунью (1943, 1945) и Учебно-просветительского отдела (1944–1945) Отряда 731. Лично участвовал в проведении опытов на людях. Военный преступник.

² *Протокол допроса японского военнопленного Ниси Сюньэй (Тосихидэ) от 15–17 января 1947 г.* Машинопись на русском языке. Государственный архив Российской Федерации. Ф. Р-9492. Оп. 10с. Д. 147. Л. 405–417. Заверенная копия.

³ 北里 柴三郎, 1853–1931; японский врач, бактериолог. Член Японской академии наук (1906). Номинант Нобелевской премии по физиологии или медицине (1901). Ученик Роберта Коха и организатор санитарной службы Японии. Происходил из рода самураев. Его фамилия 「北里」, как и многие японские фамилии, записанные иероглифами (кандзи), традиционно имела несколько прочтений. Она могла читаться, как 「キタザト」 (Kitazato) и 「キタサト」 (Kitasato), и изначально читалась первым прочтением. Однако после того, как учёный во время стажировки в Германии подписал себя, как «S. Kitasato» (поскольку в немецком языке «z» читается как «ц»), стали использовать второе прочтение. Обратите внимание, что при написании восточноазиатских имён сначала пишется фамилия, а затем имя (иногда во избежании путаницы все буквы фамилии пишут заглавными буквами).

(местные обычаи запрещали патологоанатомические исследования), предложил сравнить заболевание с известными болезнями и определить, на какое из них оно больше всего похоже. И поскольку при чуме имеет место воспаление селезёнки, то она больше всего похожа на сибирскую язву, возбудитель которой лучше всего выделяется из крови. Логика Китасато оказалась верной, и уже 20 июня, впервые в мире, возбудитель чумы был выделен, причём предложенный метод хотя и требовал высокого содержания бактерий в крови, позволял избежать манипуляций с бубонами и, соответственно, не причинять лишней боли пациенту¹).

Эпидемиологическая картина искусственной вспышки, как правило, характеризуется сжатой кривой эпидемиологического процесса ввиду отсутствия новых инфицированных, поскольку воздействие на восприимчивые организмы будет происходить примерно в одно и то же время. То есть если завезённая чумная блоха будет заражать постепенно (кушая одного за другим), то воздействие аэрозолированных спор будет одномоментным, хотя это не всегда так. Блоха может быть убита первым инфицированным, а споры – инфицировать постепенно по мере распространения (нельзя забывать и про вторичное инфицирование), поэтому на практике увидеть сжатость эпидемиологической картины бывает достаточно сложно, особенно если имело место множественное применение возбудителя из разных точек. Куда важнее и правильнее видеть не характерные для природной вспышки детали – невозможную эпидемиологию. Например, в случае аварии на военном объекте Свердловск-19 инфицированию подверглись жители отдельных улиц Свердловска (по пути движения спор), поэтому официально объявленная причина «заражение мяса на рынке» не подтверждается эпидемиологически, поскольку жертв связывает проживание на конкретной улице, а не поход на рынок. Кроме того, как мы помним, патологоанатомическое исследование обнаружило характерную для ингаляционной формы шапочку кардинала, которой не бывает при желудочно-кишечной форме, то есть официальная причина не подтверждается и клинически. И в этом случае ати-

¹ Подробнее о Китасато Сибасабуру можно почитать: Горшков-Кантакузен В. А. *Врач Китасато Сибасабуру: достижения и посмертные почтения в синтоизме*. Японские исследования. 2024; 3:86–97; DOI: 10.55105/2500–2872–2024–2–86–97.

пичная клиническая картина также служит сигналом искусственной вспышки¹⁾, например, когда речь идёт о лёгочной форме болезни с поражением глубоких отделов лёгких, поскольку они поражаются только в случае переведения патогена в мелкодисперсный аэрозоль (менее 2 мкм), что крайне редко может быть в природе и чаще указывает на применение специальных диспергирующих приборов и боеприпасов. Кроме того, могут проявляться крайне редкие симптомы, как, например, «кишечные» при лёгочной форме сибирской язвы у жертв аварии на военном объекте Свердловск-19 и Amerithrax.

Вполне возможно, что кто-то уже задумался о случаях с барабанами или героиновых наркоманах, и задаётся вопросом: почему тогда эти вспышки природные? Дело в том, что в обоих случаях вероятность того, что кто-то специально контаминировал барабаны или героин, чтобы инфицировать этих людей, почти равна нулю, поскольку главным аргументом здесь является наличие умысла. Если бы речь шла о высокопоставленном чиновнике или эти истории могли бы вызвать панику, то можно было бы заподозрить искусственную природу инфицирования. Таким образом, очень часто граница между природной и искусственной вспышками весьма прозрачна и упирается в вопрос мотивации. Однако нельзя исключать вероятность искусственного инфицирования в результате аварии, вызванной халатностью, как в случае военного объекта Свердловск-19. В такой ситуации мотива инфицирования не будет.

Также к невозможной эпидемиологии относят выделение нехарактерного для данной местности штамма возбудителя, поскольку образованный террорист будет стремиться замаскировать искусственную вспышку под природную. Например, в местности, эндемичной по туляремии, вспышка этого заболевания сама по себе подозрений не вызовет, однако выделение штамма X при циркуляции в местности только штамма Y ставит под вопрос природный

¹ Модельные исследования показывают, что синдромальный надзор имеет преимущества перед клиническим выявлением инфекции (по анализу крови), позволяя, например, при аэрозолировании 1 кг спор сибиреязвенного микроба выявить инфекцию в среднем на сутки раньше, однако он даёт 1 ложную тревогу каждые 10 дней, что в значительной степени нагружает систему здравоохранения (см. Buckeridge D. L., Owens D. K., et al. *Evaluating detection of an inhalational anthrax outbreak*. Emerg Infect Dis. 2006; 12(12):1942–1949; DOI: 10.3201/cid1212.060331).

характер вспышки. Вместе с тем не следует исключать и естественный занос нового штамма. Так, в 2012 году в урочище Большие Сары-Гобо Горно-Алтайского высокогорного очага чумы из трупа длиннохвостого суслика (*Spermophilus undulatus*) был выделен штамм чумного микроба основного подвида (4.ANT), хотя до этого на данной территории выделялись только штаммы, отнесённые к алтайским (0.РЕ4а). Появление нового штамма, наиболее вероятно, стало результатом переноса инфицированных блох птицами, возможно, каменкой-плясуньей (*Oenanthe isabellina*), предположительно из очага Хуух-Сэрх-Мунх-Хайрхан (Монголия).

Внимательно следует рассматривать и цепочку, по которой возбудитель проник в человеческую популяцию, но в обратном порядке. Обычно при искусственной вспышке в этой цепочке не хватает звеньев или же они необычные. Примером такого может служить появление переносчика, не свойственного для данной местности, или выделение возбудителя из мяса животного, привезённого из неэндемичного региона. Применительно к ситуации с Горно-Алтайским высокогорным очагом чумы отсутствие птиц, способных перенести инфицированную блоху, или же значительное расстояние между очагами, при котором блоха не сможет пережить полёт, указывало бы на искусственный характер заноса.

Жарким летом 1923 года¹ в одной из деревень Абалакской волости Тобольского уезда пало несколько лошадей, а у некоторых мужиков и вовсе явилась язва красная, верх которой наутро почернел, что стало «знамением» сибирской язвы. Все поняли: сила тут нечистая, порча наведена на деревню, не иначе. Для решения во-

¹ ЦДНИТО. Ф. 1. Оп. 5. Д. 57. Л. 146 об; по Темплинг В. Я. *Сибирская язва в традиционной культуре русских крестьян Западной Сибири*, в *Уральский сборник. История. Культура. Религия. Вып.2*. Екатеринбург, 1998, 242–257 с.

проса с порчей из соседней деревни пригласили знахарку, которая с помощью гаданий подтвердила догадку и установила виновных – трёх девушек шести, девяти и двадцати лет. Поблагодарив знахарку и отправив домой, жители деревни начали думать, что же им делать с виновными. В озере утопить нельзя – воду осквернят, но и оставлять зло в живых негоже. Покуда думали, наступил вечер, поэтому заперли их в бане до утра... А утром милиция явилась и девушек освободили.

На первый взгляд может показаться, что это история про невежество столетней давности (хотя невежества хватает и сейчас), однако нет, это история как раз таки про знание – знание признаков сибирской язвы и умение её отличать от состояний со схожими симптомами.

В случае животных сибирскую язву дифференцируют с *эмфизематозным карбункулом (экмар)*, который встречается у крупного рогатого скота, лосей, оленей и буйволов в возрасте до четырёх лет, значительно реже у годовалых овец и коз. Это острая токсикоинфекция, вызываемая спорообразующей бактерией *Clostridium chauvoei*, которая, как предполагается, всасывается из слизистой оболочки кишечника и откладывается в мышцах после транспортировки через кровоток тканевыми макрофагами. Однако патогенез этого заболевания пока ещё недостаточно изучен. Тем не менее именно отложение спор в мышцах приводит к характерному проявлению заболевания, а именно воспалительным отёкам с газообразованием (**Рис. 16.1**) в результате активации латентных спор. Последнее, вероятно, вызывается травмами (падения, удары хлыстом), хотя факторы, ответственные за прорастание, ещё не полностью установлены (если Вы сейчас поймали себя на мысли, что уже не помните, какие факторы участвуют в споропрорастании сибиреязвенного микроба, то перечитайте Главу 2). Итак, перешедшие в вегетативную форму бактерии синтезируют токсины, среди которых: α -токсин (гемолизин), разрушающий эритроциты¹; β -токсин

¹ Отмечается, что эритроциты коз, кроликов и морских свинок менее восприимчивы к гемолитическому действию токсина, чем эритроциты овец, кур и крупного рогатого скота, а эритроциты лошади устойчивы к нему. При этом чем выше температура, тем меньше необходимо токсина для гемолиза (см. Tamura Y., Kijima M., et al. *Partial characterization of the hemolysis produced by Clostridium chauvoei*. J Vet Med Sci. 1992; 54(4):777–778;

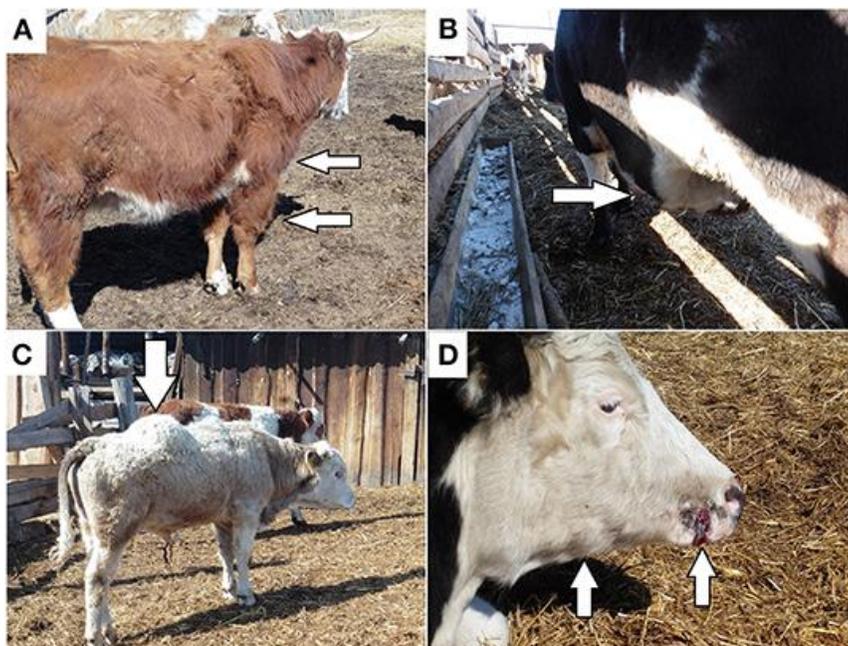


Рис. 16.1. Клинические проявления эмфизематозного карбункула. Можно видеть различную локализацию отёков (стрелки): (А) в области плечелопаточного сустава передней правой конечности, (В) в брюшной полости, (С) в области спины, (D) на морде, как следствие травм папиллом с последующим уплотнением окружающей подкожной клетчатки и мышц с образованием плотных узлов (по Blokhin A. A., 2022)

(ДНКаза), отвечающий за ядерную деградацию в мышечных клетках; γ -токсин (гиалуронидаза), ответственный за значительную дезорганизацию мышечной ткани с потерей почти всех структур; поробразующий δ -токсин (тиол-активируемый цитолизин); сиалидаза *NapA* (нейраминидаза), расщепляющая сиаловые кислоты в тканях и разрушающая эритроциты; и токсин А (*CstA*), чья функция до конца не изучена, однако антитела к нему способны нейтрализовать все цитотоксические и гемолитические эффекты заболе-

вания в 90 % случаев¹. Болезнь имеет fulminantное течение, сопровождающееся, помимо отёка (первоначально горячего и болезненного) в местах наибольшего количества мышечной ткани, высокой температурой (38–39,5 °С), вялостью и отказом от пищи, приводящим к летальному исходу за 12–60 часов. Заболевание не контагиозно, но и не эндемично. Заражение чаще всего происходит в летне-осенние месяцы, когда жарко и сухо, ввиду чего животные вынуждены пастись ближе к земле, захватывая с травой инфицированный грунт, а также активизируются комары. То есть механизмы заражения схожи с таковыми у сибирской язвы (см. Главу 5), поэтому постановка диагноза на основе эпидемиологических данных затруднительна. Поражённые мышцы отёчны, на разрезе обнаруживается жидкость с пузырьками газа. У некоторых животных могут наблюдаться серозный геморрагический лимфаденит лёгочных лимфатических узлов, сердечное кровоизлияние, кровоизлияние в серозную оболочку рубца или в подкожную клетчатку в области 5–8-х и 10–12-х рёбер (Рис. 16.2 и Рис.16.3).

Схожим заболеванием является злокачественный отёк (мионекроз), возбудителем которого являются некоторые клостридии, в частности, уже знакомая нам *Clostridium chauvoei*, а также *Clostridium perfringens* типы А и С (80–90 %), *Clostridium septicum* (20 %), *Clostridium histolyticum* (10 %), *Clostridium novyi* тип А (40 %), *Clostridium bifermentans* (10 %), *Clostridium fallax* (5 %), *Clostridium sordellii*. Заражение происходит путём попадания в рану возбудителя, присутствующего в почве и навозе, а также при проведении абортов, кастрации и иных манипуляций, приводящих к повреждению кожных покровов в нестерильных условиях (например, тяжёлых родах). Возбудитель обнаруживается в кишечнике, молоке и на коже здоровых животных, однако входными воротами инфекции являются глубокие раны, доступ кислорода в которые затруднён². Инфекционный процесс включает синтез α -, β -, γ - и δ -токсинов (описаны выше), которые приводят к образованию отёка, но не в

¹ Frey J., Johansson A., et al. *Cytotoxin CcA, a major virulence factor of Clostridium chauvoei conferring protective immunity against myonecrosis*. Vaccine. 2012; 30(37):5500–5505; DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.06.050.

² *Clostridium septicum* способен вызвать инфекционный процесс без раны, поскольку обладает большей устойчивостью к действию кислорода (см. Stevens D. L., Musher D. M., et al. *Spontaneous, nontraumatic gangrene due to Clostridium septicum*. Rev Infect Dis. 1990; 12(2):286–296; DOI: 10.1093/clinids/12.2.286).

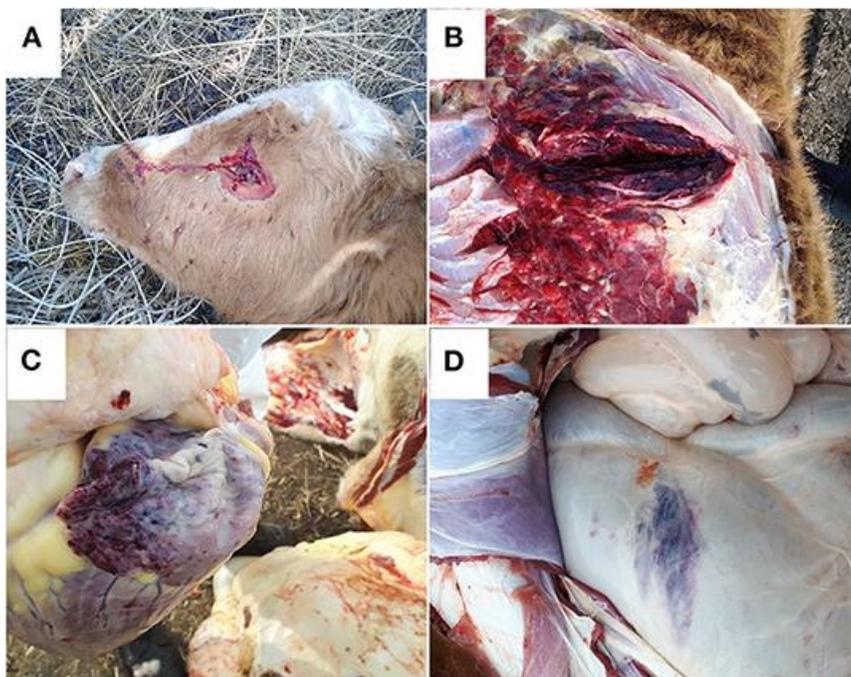


Рис. 16.2. Патологоанатомическая картина эмфизематозного карбункула. Можно видеть (А) пенистую кровянистую жидкость, вытекающую из глаз, (В) геморрагически-некротический миозит (т. е. воспаление мышц), (С) массивное кровоизлияние в сердце, а также (D) массивное кровоизлияние в серозную оболочку рибца (по Blokhin A. A., 2022)

мышечной ткани, как при эмфизематозном карбункуле, а преимущественно под кожей, в местах, наиболее богатых соединительной тканью.

Болезнь поражает все виды животных. Клинические проявления начинаются уже через 12–24 часа и развиваются стремительно, однако смерть наступает лишь к 1–3-му дню, то есть немного позднее, чем при эмфизематозном карбункуле. Температура тела также немного выше – до 41 °С (примерно как при сибирской язве). Опухоль в начале напряжённая, горячая и болезненная, но после становится дряблой, холодной и малочувствительной (центр безболезненный). Со временем она краснеет, приобретая тёмно-красный или синевато-красный цвет. При разрезе отделяется красновато-

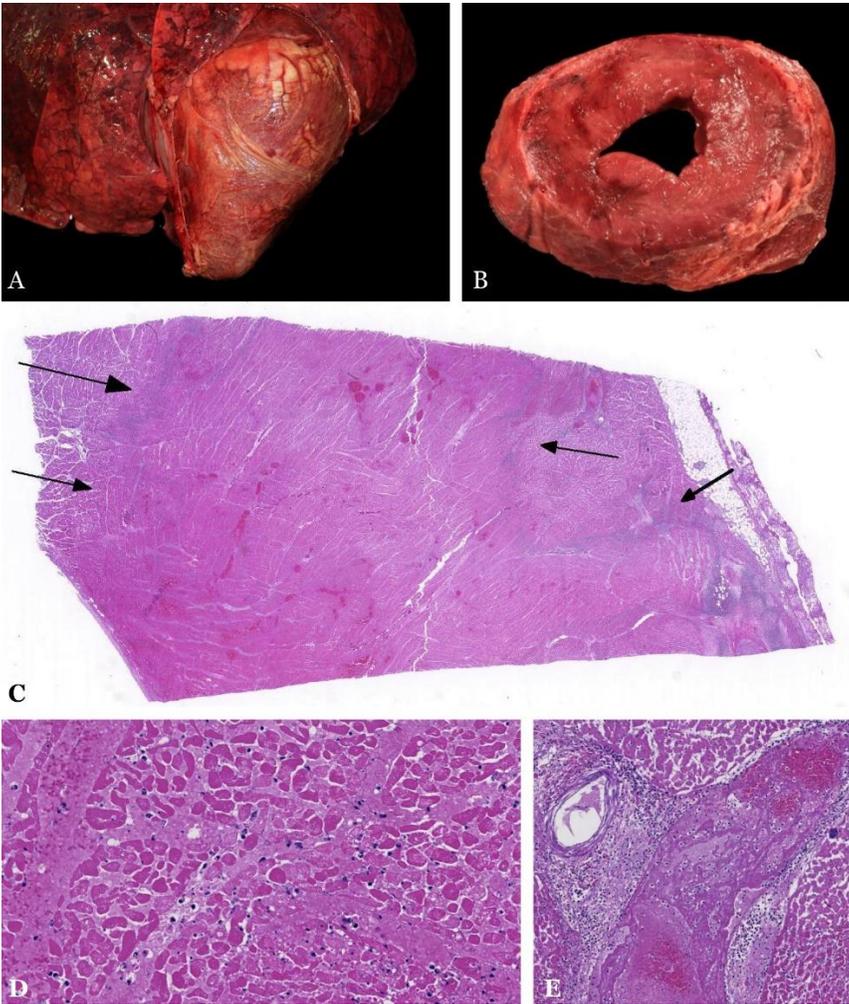


Рис. 16.3. Сердце 2-летней беременной зебу (*Bos taurus indicus*), скончавшейся от энфизематозного карбункула менее чем за сутки; окраска гематоксилин-эозином. Можно видеть обильный фибрин (A), покрывающий миокард (эпикард отогнут), а также неровную тёмно-красную область коагуляционного некроза (D) внутри миокарда (слева), края которого чётко очерчены клеточным детритом, то есть остатками разрушенных клеток (C, ув. 5x; стрелки), и уплотнены из-за денатурировавшихся белков (D, ув. 320x). Отдельные вены и лимфатические сосуды (E, ув. 80x) закупорены фибринозно-клеточными тромбами (Дело WSC ID 152401, 2015; публикуется с разрешения Joint Pathology Center, фотографии Department of the Veterinary Pathobiology, Texas A&M University)

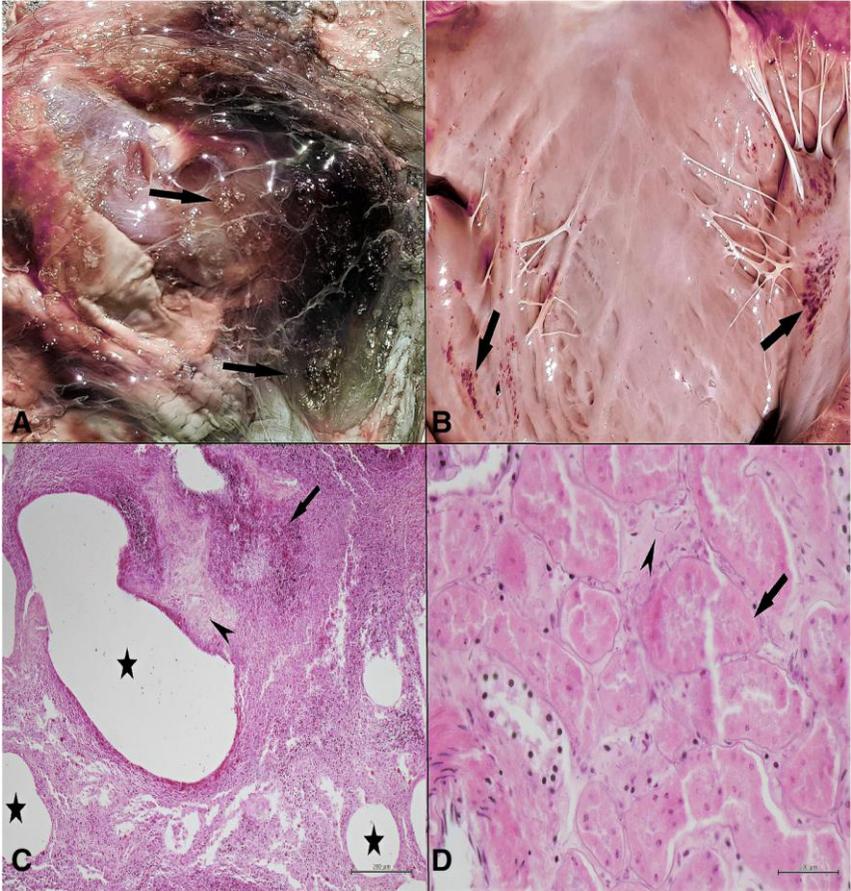


Рис. 16.4. Злокачественный отёк у 2-летней козы, вызванный *Clostridium septi-cit*, окраска гематоксилин-эозин. Можно видеть (А) зеленоватые пузырьки (стрелки) в подкожной фасции, имеющей (С) очаговый некроз (стрелки), пузырьки газа (звёздочки), обширный отёк и бактериальные скопления (наконечник), а также (В) петехиальные кровоизлияния (стрелки) в эндокарде и (D) некроз в проксимальных извитых канальцах (стрелка), диффузный отёк и скопления палочковидных бактерий (наконечник стрелки) в почке (no Gazioglu A., 2018)

жёлтая или красновато-коричневая жидкость с пузырьками газа и гнилостным запахом (Рис. 16.4).

Злокачественный отёк под названием *газовая гангрена* встречается и у человека. Механизм заражения схожий, а наибольшему риску инфицирования подвержены военные, непосредственно участвующие

щие в боевых действиях, а также наркоманы, практикующие инъекции героина, поскольку клостридии способны пережить влияние добавок (лимонную кислоту) и нагревание. Однако известны случаи развития заболевания даже на фоне малоинвазивной операции¹ и искусственного вскармливания² (Рис. 16.5 и Рис.16.6)! Болезнь начинается через 6–12 часов и сопровождается отёком тёмно-красного, синеватого или чёрного цвета, а также газообразованием в тканях. В случае поражения конечностей их, как правило, ампутируют для контроля распространения инфекции (Рис.16.7).

У овец и коз клостридии, попавшие в сычуг³, чаще всего *Clostridium septicum*, а также *Clostridium oedematiens* и *Clostridium gigas* могут привести к *брадзоту* (от норв. Bråsott – «мгновенная болезнь») – острой токсикоинфекции молодых особей (чаще только отнятых от груди), вызывающей гибель животных за 11–55 часов. Чаще всего животные заболевают поздней осенью, когда замороженная трава способна травмировать желудок. Характерной особенностью данного заболевания является достаточно долгое его протекание в скрытой форме, из-за которого видимые клинические проявления (судороги, понос, пена изо рта) проявляются за несколько часов до гибели. Тела павших животных, как правило, вздуты, из ноздрей и ануса вытекает кровянистая жидкость. Чем не картина сибирской язвы? Вместе с тем на вскрытии в подкожной клетчатке обнаруживаются серозно-геморрагические инфильтраты с пузырьками газа, что указывает именно на заражение клостридиями. Сычуг раздут и может содержать значительное количество гнилостной жидкости. Его стенки утолщены, а слизистые оболочки изъязвлены. Печень бледно-жёлтого цвета с множественными очагами некроза. Шерсть у павших животных легко выдёргивается, чего не бывает при сибирской язве.

¹ Wang X., Jiao S., et al. Case report: Clostridial gas gangrene of pelvic wall after laparoscopic rectal cancer surgery induced fatal sepsis. Front Surg. 2022; 9:822605; DOI: 10.3389/fsurg.2022.822605.

² Kircher S., Wössner R., et al. Lethal pneumatis coli in a 12-month-old child caused by acute intestinal gas gangrene after prolonged artificial nutrition: a case report. J Med Case Rep. 2008; 2:238; DOI: 10.1186/1752-1947-2-238.

³ Отдел желудка жвачных животных. У телят, питающихся молоком, в сычуге вырабатывается фермент реннин, способный расщеплять пептид, который применяется при приготовлении сычужных сыров.

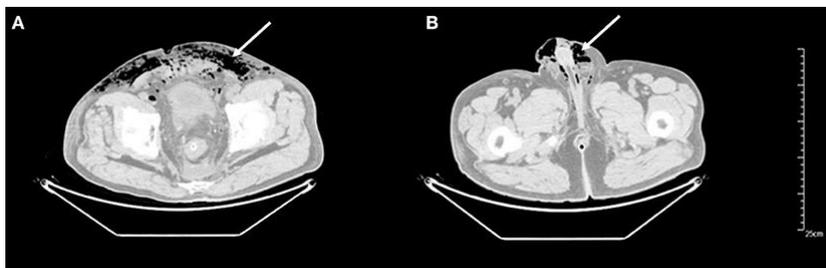


Рис. 16.5. Компьютерная томография (аксиальная проекция) нижней части живота (А) и мошонки (В) 65-летнего мужчины с избыточной массой тела.

Можно видеть газ (стрелки), как следствие газовой гангрены, вызванной *Clostridium perfringens* и развившейся после лапароскопии, выполненной для резекции опухоли прямой кишки. Данный случай является первым, когда газовая гангрена развилась после малоинвазивной операции, при проведении которой, вероятно, бактерии из кишечника (клостридии являются частью нормофлоры) были занесены в прилегающие ткани (по Wang X., 2022)

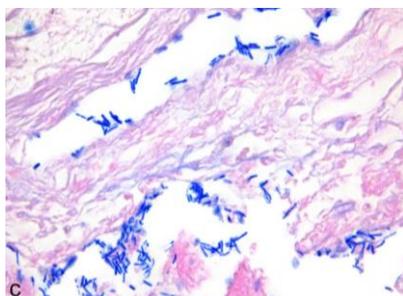
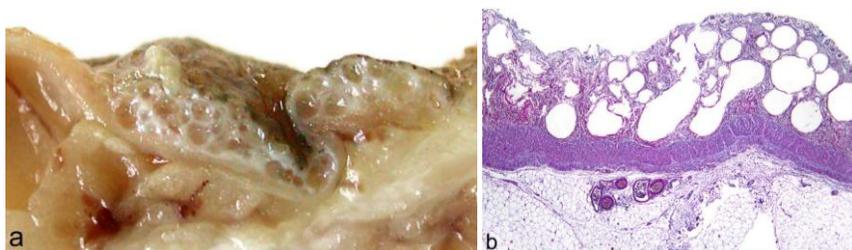


Рис. 16.6. Вторичный пневматоз толстой кишки у полугодовалого мальчика, развившийся на фоне газовой гангрены. Можно видеть (а) отёчную стенку кишечника с множественными кистами в слизистой оболочках с ареактивным некрозом без признаков воспалительной инфильтрации (b), но с бактериальными скоплениями (с) внутри и под кистами; окраска гематоксилин-эозином (b) и по Граму (с). Перинатальная асфиксия во время родов привела к тяжёлой гипоксической энцефалопатии с тетрапарезом и эпилепсией, ввиду чего родители обеспечивали искусственное питание через желудочный зонд дома. Поставляемая еда состояла из гидролизованной молочной смеси на основе аминокислот и натурального загустителя на основе семян рожкового дерева. На момент вскрытия у младенца имелось ожирение (10,3 кг). Вероятной причиной смерти явилась бактериальная инвазия стенки кишечника из его содержимого (нормофлора) вследствие снижения барьерной функции кишечника, вызванной обильным гиперкалорийным питанием (по Kircher S., 2008)

Перинатальная асфиксия во время родов привела к тяжёлой гипоксической энцефалопатии с тетрапарезом и эпилепсией, ввиду чего родители обеспечивали искусственное питание через желудочный зонд дома. Поставляемая еда состояла из гидролизованной молочной смеси на основе аминокислот и натурального загустителя на основе семян рожкового дерева. На момент вскрытия у младенца имелось ожирение (10,3 кг). Вероятной причиной смерти явилась бактериальная инвазия стенки кишечника из его содержимого (нормофлора) вследствие снижения барьерной функции кишечника, вызванной обильным гиперкалорийным питанием (по Kircher S., 2008)



Рис. 16.7. Газовая гангрена, вызванная *Clostridium perfringens*, у 35-летнего мужчины-наркомана. Можно видеть (А) значительный отёк верхней правой конечности с эритемой и волдырями (сравните его с инъекционной формой сибирской язвы на **Рис.14.1** и **Рис.14.2**), а также (В) газ в мягких тканях на рентгенограмме. Известно, что помимо инъекций наркотиков пациент практиковал внутримышечные инъекции физиологического раствора в плечо с целью провоцирования боли, что распространено среди наркоманов для восстановления после наркотической комы. В отделении интенсивной терапии пациент пробыл 30 дней, и хотя такое бывает очень редко, конечность была сохранена, но со значительными двигательными и сенсорными невральными дефицитами лучевого и локтевого нервов (по Aggelidakis J., 2011)

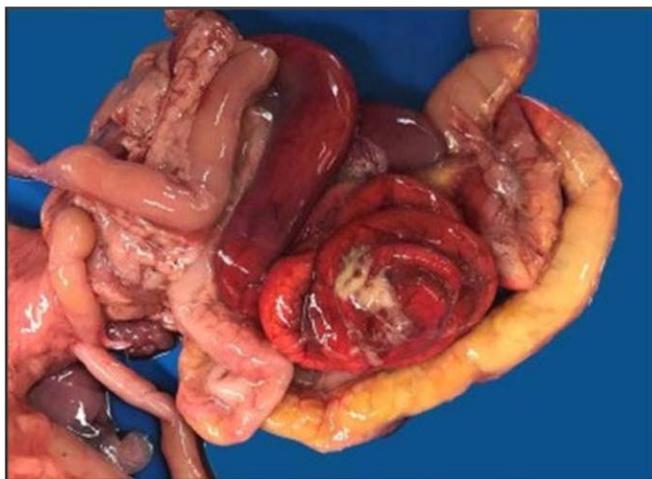
Другой представитель рода, *Clostridium perfringens*, вызывает у ягнят и телят анаэробную энтеротоксемию, проявляющуюся повышением температуры до 41 °С, угнетением сознания, потерей аппетита, диареей с кровью и слизью. Возбудитель размножается в кишечнике, продуцируя в зависимости от типа α -, β -, ϵ - и(или) ι -токсины. О первых двух говорилось ранее. Эпсилон-токсин (ϵ) представляет собой малоактивный полипептид, активирующийся кишечными протеазами (например, трипсином), который после доставки по кровотоку к клеткам органов-мишеней (сердца, лёгких, головного мозга) способствует потере («выходу») внутриклеточного K^+ , что приводит к клеточной гибели. Йота-токсин (ι) представляет собой белок, предотвращающий образование нитевидного актина, что приводит к разрушению цитоскелета клетки. Болезнь развивается стремительно, ввиду чего смерть может наступить уже на 3–4-е сутки, реже к концу недели.

Отдельно выделяют энтеротоксемию у овец и коз, вызванную *Clostridium perfringens* тип D, когда животное перекармливают высо-

коуглеводным кормом или стремительно увеличивают содержание углеводов в рационе питания, из-за чего углеводная масса попадает в тонкий кишечник, способствуя размножению возбудителя и, соответственно, синтезу токсинов (α и ϵ). Ранее считалось, что новорождённые не подвержены заболеванию из-за низкой активности трипсина в кишечнике, однако штаммы-возбудители, синтезирующие λ -токсин, способны вызывать инфекционный процесс из-за способности токсина активировать ϵ -токсин. Первый такой случай был зарегистрирован в апреле 2021 года¹ (Рис. 16.8).

Ещё одним заболеванием, от которого следует дифференцировать сибирскую язву, является *пастереллёз* (*геморрагическая септицемия*), который встречается у крупного рогатого скота, овец, свиней, буйволов, слонов, лошадей, кошек и собак. Эта болезнь, вызывае-

Рис. 16.8. Поражения кишечника нигерийского карликового козлёнка (*Capra aegagrus hircus*), вызванные штаммом *Clostridium perfringens* тип D, синтезирующим λ -токсин.



Можно видеть отёк брыжейки толстой кишки, диффузный застой в толстой кишке, кровоизлияния в слизистую оболочку и фибрин, прикреплённый к серозной оболочке толстой кишки. Козлёнок родился на ферме в округе Ривесайд (штат Калифорния, США) без происшествий и был вскормлен в первый час жизни. Вскоре у него развилась диарея, и на второй день жизни он умер (по Acevedo H.D., 2023). Сравните эти поражения с поражениями при сибирской язве на Рис. 7.16.

¹ Acevedo H. D., Schlesinger M. S., et al. Enterotoxemia produced by lambda toxin-positive *Clostridium perfringens* type D in 2 neonatal goat kids. J Vet Diagn Invest. 2023; 35(4):448–451; DOI: 10.1177/10406387231176995.

мая грамотрицательной бактерией *Pasteurella multocida*, распространена преимущественно в Азии, Африке и Латинской Америке, однако недавняя крупная вспышка, произошедшая на юге Испании¹, свидетельствует о её актуальности и для европейского региона.



Рис. 16.9. Пастереллёз у слонов (*Loxodonta africana*) в Ботсване и Зимбабве. Можно видеть (а) вздутую тушу с кровянистыми выделениями, (b) ткань лёгкого с небольшими участками уплотнения и гиперемии, (с) желудок, с кровоизлияниями на серрозной оболочке желудка, (d) прилегающую к желудку печень с закруглённой границей, указывающей на сильный отёк, и паренхиматозной гиперемией, (е) селезёнку с множественными капсулярными кровоизлияниями и увеличенным селезёночным лимфатическим узлом, а также (f) грудную диаграмму и лёгкое с кровоизлияниями (по Foggin C. M., 2023)

Заболевание развивается стремительно, приводя к гиперемии, отёкам и кровоизлияниям в подкожную клетчатку и органы. Трупы павших животных вздуты, из носа, глаз и ануса может выступать кровянистая жидкость (Рис. 16.9). Массивные бактериальные скопления обнаруживаются в печени, селезёнке и лимфатических узлах. Характерной особенностью течения пастереллёза у свиней является фарингит с отёками в подчелюстной области и шее на фоне повышенной температуры тела

(выше 41 °С), тогда как при фарингеальной форме сибирской язвы

¹ Cuevas I., Carbonero A., et al. First outbreak of bovine haemorrhagic septicaemia caused by *Pasteurella multocida* type B in Spain - Short communication. Acta Vet Hung. 2020; 68(1):8–11; DOI: 10.1556/004.2020.00014.

указанные клинические проявления протекают без повышения температуры.

Заражение человека возможно преимущественно через укусы и царапины животных, а у владельцев домашних животных возбудитель также может колонизировать трахею и бронхи. Инфекционный процесс у иммунокомпетентных лиц развивается редко, и чаще болезнь протекает в лёгкой, малозаметной форме. Однако у пожилых людей она может сопровождаться поражениями кожи, мягких тканей, костей, суставов, верхних и нижних дыхательных путей, вызывая менингит, бактериемию, эндокардит и перитонит. Известен случай¹ фульминантного течения у 72-летнего мужчины, при котором имело место мозговое кровоизлияние без признаков менингита (Рис. 16.10). И поскольку иных нарушений не имелось, равно как и укусов или царапин, то инфекционная этиология не была заподозрена, ввиду чего пациент не получал антибиотикотерапию и скончался спустя 72 часа после поступления. В этом смысле грамотный сбор эпидемиологического анамнеза важен, даже когда клиническая картина имеет неинфекционный характер.

Дифференцируют сибирскую язву у животных также от состояний, сопровождающихся вялостью, апатией и отсутствием аппетита, например, отравлений, лейкозов и солнечных ударов, а также от бабезиоза (*пироплазмоза*), вызываемого простейшими из рода *Babesia*. Течение последнего похоже на септическую форму сибирской язвы, однако имеется выраженная желтушность слизистых и серозных покровов, незначительное увеличение селезёнки (без размягчения пульпы), отсутствует серозно-геморрагическое воспаление кишечника.

У свиней дополнительно отличают от *фарингита*, в форме которого, как мы помним, может протекать сибирская язва. Острое течение *эризипелоида* (*рожи свиней*), вызываемого бактерией *Erysipelothrix rhusiopathiae*, характеризуется сине-красным окрашиванием кожи, воспалением желудка и тонкого кишечника с гиперемией лимфатических узлов. Незначительно увеличена селезёнка, однако при её разрезе не стекает дёгтеобразная жидкость, как это

¹ Diaz E., Serrano-Coll H., et al. *Case Report: Septic shock due to Pasteurella multocida in an immunocompetent elderly from a rural area of the Colombian Caribbean*. Front. Trop. Dis. 2023; 3:1047842; DOI: 10.3389/fitd.2022.1047842.

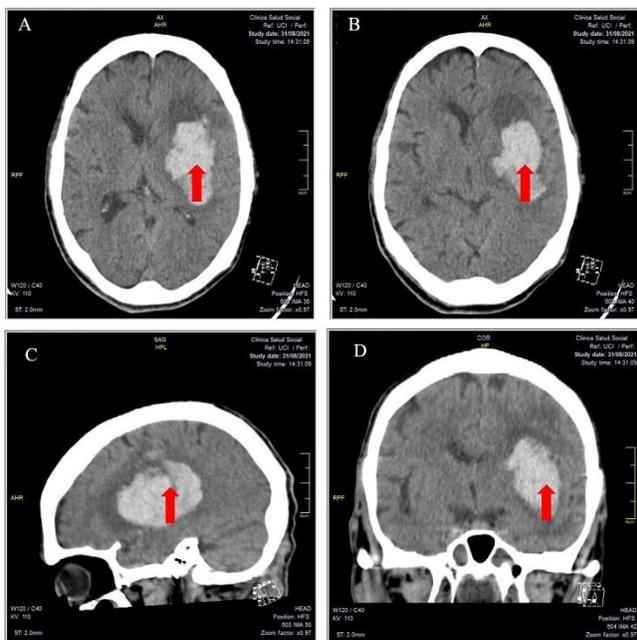


Рис. 16.10. Компьютерная томография головного мозга 76-летнего мужчины, на которой видны признаки (стрелки) ишемического поражения с геморрагической трансформацией, коллапсом левого верхнего желудочка, гематомой левого базального ганглия головного мозга, которые возникли на фоне пагостереллеза (по Diaz E., 2023)

бывает при сибирской язве, на которую также указывают воспаления только лимфатических узлов головы и шеи. При остром течении *африканской чумы лошадей* и других непарнокопытных, вызываемой РНК-содержащим вирусом рода *Orbivirus*, клиническая картина схожа с сибиреязвенной, однако при кормлении животное глубоко опускает морду в ведро с водой, пытается пить, но вода вытекает, то есть демонстрирует поведение, которого не бывает при сибирской язве.

У человека кожную форму сибирской язвы следует в первую очередь дифференцировать от иных кожных поражений, чаще всего имеющих стафилококковое или стрептококковое происхождение. *Фурункул (чирей)* представляет собой гнойное воспаление волосяного фолликула, а их скопление уже именуют *карбункулом*. Как пра-

вило, они не имеют струпа и характеризуются небольшой отёчностью, покраснением кожи на вершине и нагноением. При *флегмонной* формируется под кожной клетчаткой, распространяясь в окружающие ткани без чётких границ, тогда как при *рожистом воспалении*, при котором гной бывает крайне редко, границы воспаления чёткие и напоминают очертания континентов на географической карте. При *сепе*, вызываемом *Burkholderia mallei*, возбудитель проникает через повреждённую кожу, в результате чего образуется папула, которая переходит в пустулу с кровянистым содержимым, и, наконец, к концу второго дня формируется кратерообразная язва с «сальным» дном. Похожая картина обнаруживается и при гангренозной форме *опоясывающего лишая (герпеса)*. Однако поскольку данное заболевание, вызываемое вирусом ветряной оспы (*Varicella zoster*), протекает лишь у лиц, перенёсших ранее ветряную оспу, грамотный сбор анамнеза может способствовать дифференцировке. С другой стороны, первичный аффект при *риккетсиозах* напоминает сибиреязвенный, однако сопровождается сыпью по всему телу, чего не бывает при сибирской язве.

Перечислять заболевания, при которых «кожные» проявления похожи на сибиреязвенные можно долго, однако наиболее надёжным параметром при дифференцировке является наличие боли. Как мы помним, при сибирской язве боли **нет**. Звучит просто, но на практике до 40 % случаев кожной формы сибирской язвы воспринимаются специалистами как карбункулы, фурункулы, флегмоны, укусы насекомых (**Рис. 16.11**), ожоги и даже ушибы, а в 14 % случаев хирургическое вмешательство (вскрытие) проводят на амбулаторном уровне. И в этой связи сбор эпидемиологического анамнеза имеет первостепенное значение в правильной постановке диагноза.

Важно также помнить, что при сибирской язве чаще всего поражаются открытые участки кожи, преимущественно верхние конечности (руки, кисти, предплечья), шея, лицо (брови), но не волосяная часть головы (по крайней мере таких случаев зарегистрировано не было). Первичный аффект чаще бывает единичным и сухим, тогда как при иных бактериальных поражениях почти всегда будет гнойник или их скопление. Однако нельзя забывать и про исключения.



Рис. 16.11. Первичный аффект при сибирской язве, похожий на укус насекомого. Настоящая фотография, любезно предоставленная Сапарбаем Тезекбаевичем Жолдошевным, относится к случаю¹, произошедшему в августе 2023 года, когда семья забила больного двухмесячного телёнка, предварительно вакцинированного от сибирской язвы живой вакциной (штамм 55-ВНИИВиМ), после чего приготовила и

съела. При этом восьмимесячный ребёнок наряду с грудным молоком матери получал пережёванное ею мясо. Единственным видимым проявлением болезни была везикула, заполненная серозной жидкостью, размером 0,5 x 1 мм, без чёрного струпа, окружённая красным валиком. В месте образования везикулы наблюдались гиперемия и значительная припухлость, безболезненная при пальпации. В результате проведённой антибиотикотерапии ребёнок поправился. Эпидемиологическое расследование показало, что причиной инфицирования стали нарушение холодовой цепи при транспортировке вакцины, а также нарушение схемы вакцинации животного (в 2 месяца при рекомендации в 3 месяца). Также, вероятно, семья нарушила правило по запрету на убой вакцинированного животного, поскольку из почвы на месте убоя телёнка также обнаружен сибиреязвенный микроб

Кишечную форму дифференцируют от брюшного тифа, вызываемого *Salmonella enterica* подвид *enterica* серовар Typhi (для краткости пишут: *Salmonella Typhi*). Эта болезнь тоже характеризуется лихорадкой (правда, волнообразной) и симптомами интоксикации, однако начало болезни постепенное, а на коже возможно характерное высыпание (розеолы). Дифференцируют от различных неинфекционных патологий кишечника, в частности, перфорации кишок, острого панкреатита, тромбоза сосудов брыжейки, а также кишеч-

¹ Mamatkulova N. M., Zholdoshev S. T., et al. *A case study on anthrax in an eight-month old infant at Kyrgyz Republic*. Bioinformation. 2024; 20(3):301–304; DOI: 10.6026/973206300200301.

ной непроходимости (илеус), от острой формы которого сибирскую язву отличает наличие кровянистых выделений.

Лёгочную форму, в первую очередь ингаляционную, дифференцируют от острых респираторных заболеваний иной этиологии. Ранее уже говорилось, что при сибирской язве обычно повышены печёночные ферменты (аланинаминотрансфераза или аспартатаминотрансфераза) при нормальном количестве лейкоцитов и низком уровне натрия в сыворотке. Имеются тахикардия, а также тошнота или рвота. Может быть увеличено средостение. Однако хотя эти признаки и выделяются в качестве дифференциально-диагностических, нельзя забывать, что они не универсальны.

Дифференцируют лёгочную форму сибирской язвы от лёгочной формы туляремии, сапа, чумы и крупозной пневмонии. Клинические проявления этих заболеваний похожи, однако при *туляремии*, вызванной *Francisella tularensis*, как правило, не бывает кровавой мокроты, течение заболевания вялое, а при *сапе*, вызываемом *Burkholderia mallei*, мокрота вязкая и густая. Характерных особенностей при чуме и крупозной пневмонии больше.

Чума	Сибирская язва	Крупозная пневмония
катаральные явления (т. е. симптомы простуды)		
отсутствуют	Присутствуют	возможны
а у с к у л ь т а т и в н а я к а р т и н а		
скудная (не соотносится с тяжестью заболевания)	влажные хрипы, возможен шум трения плевры	влажные хрипы, бронхиальное дыхание (грубое, выслушивается на вдохе и выдохе; похоже на звук при произнесении буквы «х» открытым ртом)
б о л е в о й с и н д р о м		
отсутствует	Незначительный	выраженный

мокрота		
жидкая или стекловидная, может включать примеси крови	слизистая с незначительной примесью крови	слизисто-гнойная, ржавая, может быть с примесями изменённой крови
поражения		
в виде рассеянных мелких очагов	в виде рассеянных крупных очагов	целой доли (значительной её части), нескольких или всех долей
↓	↓	↓
гладкая структура (мелкие очаги некроза) на патологоанатомическом вскрытии	крупные очаги некроза на патологоанатомическом вскрытии	зернистость на патологоанатомическом вскрытии
изменения плевры		
серозный или серозно-геморрагический плеврит с большим количеством жидкости в плевральной полости (до 2 л)	возможен плеврит с кровоизлияниями в плевральные листки, но без перехода из фиброзного в гнойный	плеврит на стороне поражённого лёгкого, возможен переход из фибринозного в гнойный
возможно распространение инфекционного процесса на трахею и бронхи	возможно распространение инфекционного процесса на трахею и бронхи	возможно распространение инфекционного процесса на бронхи

Наконец, нельзя забывать и про те штаммы близкородственных бактерий, что вызывают сибирязвенноподобные состояния у животных и людей. С некоторыми из них мы уже сталкивались ранее. В основном это штаммы *B. cereus* ss, включая Vcbva (Глава 4), но существуют и другие. Так, в Главе 9 подробно говорилось о штаммах, вызывающих «сибирскую язву» у черепах, в частности, штамме *B. tropicus* JMT, несущем на единственной плазмиде гены *суа* и *раgA*

(отёчный фактор), а также гены, кодирующие синтез гиалуроновой кислоты и экзополисахарида. Недавно другой штамм, отнесённый к *B. tropicus* и имеющий плазмиды pBCXO1 и pBC210, гомологичные плазмидам сибиреязвенного микроба¹, стал² этиологическим агентом «сибирской язвы» у больших рыжих кенгуру (*Macropus rufus*), обнаруженных мёртвыми без каких-либо внешних клинических проявлений болезни (при этом к *B. anthracis* кенгуру почти не восприимчивы). Болезнь протекала крайне стремительно; на вскрытии обнаружены лимфаденит, поражения желудка (Рис. 16.12) и селезёнки, причём последняя сильно увеличена.

У человека сибиреязвенноподобные заболевания связаны с *B. cereus* ss. Так, чёрный струп на коже у 70-летнего рабочего из штата Флорида (США), соответствующий кожной форме сибирской язвы, был вызван штаммом *B. cereus* FL2013, имеющим плазмиду pBCXO1. А штамм *B. cereus* 03BB87, имеющий плазмиды pBCXO1 и pBCXO2, привёл³ к инфекционному процессу у 56-летнего иммунокомпетентного мужчины из штата Техас (США), симптомы которого были похожи на лёгочную форму сибирской язвы, сопровождающуюся диареей. Однако на фоне высокого содержания возбудителя, прикреплённого к клеткам эпителия, в бронхоальвеолярном лаваже (Рис. 16.13), были и не характерные для лёгочной (ингаляционной) формы сибирской язвы проявления. В частности, в том же бронхоальвеолярном лаваже полиморфно-ядерных лейкоцитов и лимфоцитов оказалось немного, тогда как в крови, наоборот, лейкоцитов было больше нормы ($21 \times 10^9/\text{л}$ при норме $4\text{--}9 \times 10^9/\text{л}$). Лимфатические узлы средостения оказались не увеличены, хотя, как мы помним, именно из них при сибирской язве возбудитель начинает свою миграцию в другие органы. С другой стороны, такие важные дифференциально-диагностические признаки, позволяющие на начальных этапах отличить сибирскую язву от других острых респираторных заболеваний, как тошнота и

¹ Если Вы уже успели забыть, что это за плазмиды, а «РА», «LF» и «EF» выглядят всего лишь как непонятные аббревиатуры, то перечитайте Главу 3.

² De Cecco B. S., Falconnier N. G., et al. *Pathologic and genomic characterization of an outbreak of anthrax-like disease caused by Bacillus tropicus (formerly atypical Bacillus cereus) in red kangaroos (Macropus rufus)*. *Vet Pathol.* 2025; 62(3):332–342; DOI: 10.1177/03009858241306399.

³ Wright A. M., Beres S. B., et al. *Rapidly progressive, fatal, inhalation Anthrax-like infection in a human: case report, pathogen genome sequencing, pathology, and coordinated response*. *Arch Pathol Lab Med.* 2011; 135(11): 1447–1459; DOI: 10.5858/2011–0362-SAIR.1.



Рис. 16.12. Поражения желудка у большого рыжего кенгуру. Можно видеть геморагии и множественные изъязвления слизистой (по de Cecco B. S., 2025)

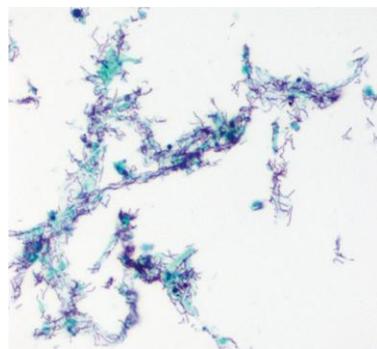


Рис. 16.13. Скопления *V. cereus* ss в бронхоальвеолярном лаваже; окраска по Папаниколау, ув. 20х (по Wright A. M., 2011; © 2010 College of American Pathologists)

рвота, присутствовали. Описанный случай интересен тем, что пациент занимался сваркой дома, и это не было его профессией, поскольку чаще всего такие штаммы колонизируют именно лёгкие сварщиков, а также тех, кто работает с металлами, вызывая сибирезвенную пневмонию сварщиков. Опасность этого заболевания заключается в высокой летальности (около 86 %). Отличительной особенностью, как и в предыдущем случае, является выраженный лейкоцитоз (до $50 \times 10^9/\text{л}$ при норме $4-9 \times 10^9/\text{л}$), тогда как поражения лёгких в целом похожи на сибирезвенные (Рис. 16.14).

Все эти штаммы, вызывающие столь опасные инфекции, стали выделяться совсем недавно, в нынешнем тысячелетии, и вполне вероятно, что в будущем будут изолироваться новые, поскольку, по-видимому, мы живём в уникальное время нового эволюционного витка *V. cereus* complex. При это высокая летальность даже на фоне антибиотикотерапии в случае инвазии этими штаммами добавляет сложности в диагностику. Особенно когда клиническая картина заболевания не соответствует сибирской язве, по культуральным признакам возбудитель идентифицирован как *V. cereus* ss, а по ПЦР обнаружены гены, характерные для сибирезвенных плазмид...

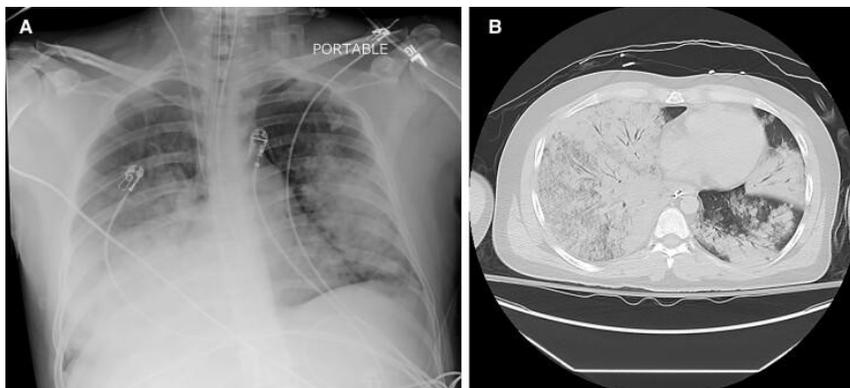


Рис. 16.14. Поражения лёгких у 34-летнего мужчины-сварщика из штата Луизиана (США) при сибирезвённой пневмонии сварщиков. На рентгенограмме (А) можно видеть двухсторонние инфильтраты, а на компьютерной томограмме брюшной полости (В) – диффузную двухстороннюю консолидацию (по Hendricks К., 2022). Сравните их с поражениями на Рис. 13.2 и Рис.15.5

С другой стороны, бывают случаи настолько атипичные, что инфекционное заболевание подозревается чуть ли не в последнюю очередь, и следующий случай очень наглядно это иллюстрирует.

2018 год¹, Идзумо, Япония. У 60-летнего мужчины, ежедневно работающего в домашнем саду, внезапно появляется сильная боль в правом плече и паху, а также онемение правой руки. Спустя 3 часа он вызывает скорую помощь, которая доставляет его в местную больницу, где развиваются кровохарканье, и гипоксемия (сатурация < 90 %) с тяжёлым форсированным дыханием, и тахипноэ. Пациенту проводят интубацию трахеи и на вертолёте санитарной авиации доставляют в Центральную больницу префектуры Симанэ (島根県立中央病院). При осмотре в отделении неотложной помощи (спустя 6 часов после появления первых симптомов) выслушивается грубый хрип с преобладанием в правой латеральной области. Кроме того, через трахеальную трубку непрерывно отсасывается небольшое количество крови, хотя бронхоскопия не выявила источника кровотечения.

¹ Ishida R., Ueda K., et al. *Fatal community-acquired Bacillus cereus pneumonia in an immunocompetent adult man: a case report.* BMC Infect Dis. 2019; 19:197; DOI: 10.1186/s12879-019-3836-3.

На компьютерной томографии обнаружена инфильтрация, преобладающая в правой верхней доле и распространяющаяся на правую среднюю и нижнюю доли, а также левую область ворот лёгкого (Рис. 16.15). Анализ газов крови указывает на острую дыхательную недостаточность. Однако анализ крови не выявил отклонений, за исключением небольшого повышения уровня креатинина сыворотки (121 мкмоль/л при норме 72–115 мкмоль/л). На электрокардиографии обнаружен выраженный подъём сегмента ST (в нижних отведениях), а на эхокардиографии – выраженный гипокинез (т. е. ослабление движения) нижней стенки сердца. Также был повышен уровень тропонина T в сыворотке (0,487 нг/мл при норме менее 0,015 нг/мл), что в совокупности указывает на инфаркт миокарда, хотя в анамнезе со стороны сердечно-сосудистой системы имелась только гипертензия (пациент принимает эналаприл, карведилол и амлодипин).

В результате перед хирургами стояло две противоречивые задачи: с одной стороны, нужно было восстановить кровоснабжение сердца (реваскуляризация коронарной артерии), а с другой – остановить кровотечение в альвеолах (альвеолярный гемостаз). Однако поскольку этиология альвеолярного кровотечения неизвестна, и установить её локализацию в условиях искусственной вентиляции лёгких затруднительно, приоритет был отдан первой задаче. После искусственного снижения свёртываемости крови путём введения гепарина (гепаринизации) на коронарной ангиографии подтверждён тяжёлый стеноз (99 %) средней правой коронарной артерии на уровне второго сегмента с задержкой кровотока из-за тромбозиса на фоне инфаркта миокарда 2-й степени. В результате после аспирации тромба имплантирован стент с лекарственным покрытием, а введение антиагрегантных препаратов отложено для минимизирования риска развития кровотечений. Далее проведена транскатетерная артериальная эмболизация для лечения альвеолярного кровотечения, однако это лишь его усилило, из-за чего кровь начала вытекать через трахеальную трубку, что существенно затруднило поддержание оксигенации и кровообращения. Пациент скончался (спустя 12 часов после появления симптомов).

Патологоанатомическое исследование выявило картину некротизирующей геморрагической пневмонии, похожей на сибиреязвен-

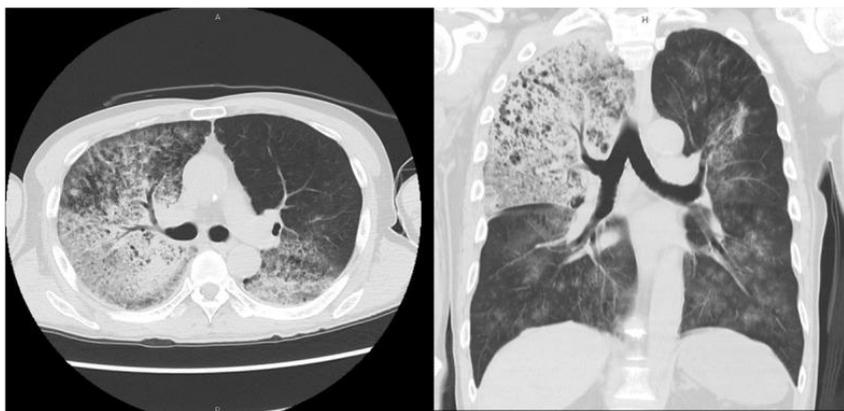


Рис. 16.15. Компьютерная томография лёгкого пациента, на которой видна инфильтрация в правом лёгком (по Ishida R., 2019)

*ную, с огромной пролиферацией грамположительных палочек, идентифицированных как *B. cereus* ss, которые также были обнаружены в образцах мокроты. Исследование штамма показало присутствие рХО1-подобной плазмиды, несущей гены, кодирующие синтез летального фактора и протективного антигена.*

Вполне вероятно, что от всего вышесказанного могло сложиться ложное впечатление, будто бы сибирскую язву следует подозревать при малейших симптомах, на неё похожих. И действительно, в клинической практике случаи гипердиагностики не редкость. Так, сибирскую язву подозревают при отёках неинфекционной этиологии, абсцессах и даже гумме – новообразовании, возникающем в результате третичной стадии сифилиса. Известны даже случаи, когда диагноз «сибирская язва» ставился при аппендиците! Однако к постановке диагноза следует подходить взвешенно и спокойно, с учётом клинической картины и анамнеза, как клинического, так и эпидемиологического. Дифференциальная диагностика сложна ввиду большого количества заболеваний со схожими клиническими проявлениями, а также вариабельностью проявлений при самой сибирской язве, часто поздним обращением пациентов за медицинской помощью и отсроченностью результатов лабораторного исследования во времени, поэтому постановка верного диагноза напрямую зависит от грамотной и слаженной работы специали-

стов по инфекционным болезням, эпидемиологии, бактериологии и особо опасным инфекциям.

Теперь, когда мы точно определили, что у конкретного пациента не схожее заболевание, а именно сибирская язва, встаёт вопрос её классификации. В самом начале уже говорилось, что *charbon malin* подразделяли по способу заражения на спонтанную и контактиозную, а по клиническим проявлениям – на основную (кожную), симптоматическую (системную) и внутреннюю (желудочно-кишечную). В Тюменском уезде (Сибирь)^{<1>} её подразделяли на две формы – «нутренняя» (внутренняя) и «верховая» (наружная). Первая развивается внутри организма, тогда как вторая может быть на коже («чирьевая») или в виде опухоли («поплавная»).

Время шло. Знания накапливались и систематизировались. Было предложено выделять кожную, ингаляционную (лёгочную) и гастроинтестинальную (кишечную) формы сибирской язвы, причём в рамках кожной формы предложено выделять карбункулёзный, эдематозный, буллёзный и эризипелоидный варианты^{<2>}, что, однако, не всеми принимается. С другой стороны, некоторые специалисты предлагают классифицировать заболевание не по клиническим проявлениям, а по характеру инфекционного процесса. Так появилось деление на локализованную (кожную) и генерализованную (септическую) формы³, что позволяет учитывать существование редких форм, например, сибирезверного менингита, который

¹ ГАТО. Ф. И-7. Оп. 1. Д. 70. Л. 99–99об; ; по Темплинг В. Я. *Сибирская язва в традиционной культуре русских крестьян Западной Сибири*, в *Уральский сборник. История. Культура. Религия. Вып.2*. Екатеринбург, 1998, 242–257 с.

² Никифоров В. Н. *Кожная форма сибирской язвы человека*. М.: Медицина, 1973, 132 с.

³ Слюсарь А. И., Беседина Е. И., и др. *Сибирская язва (антракс). Эпидемиология, клиника, лечение, профилактика: Учебное пособие*. Донецк, 1997, 13 с.

может развиваться как на фоне кожной формы, так и на фоне лёгочной. Тем не менее единого мнения о классификации до сих пор нет.

На международном уровне, исключительно для целей медицинской статистики, используется *Международная статистическая классификация болезней и проблем, связанных со здоровьем, Десятого пересмотра (МКБ-10)*, и начат переход (до 2027 года) на классификацию *Одиннадцатого пересмотра (МКБ-11)*. Приведём обе классификации.

МКБ-10

Код	Нозологическая форма
A22	Сибирская язва
A22.0	Кожная форма сибирской язвы <i>Злокачественные:</i> <i>карбункул</i> <i>пустула</i>
A22.1	Лёгочная форма сибирской язвы <i>ингаляционная форма сибирской язвы</i> <i>болезнь тряпичника</i> <i>болезнь Вулсортера</i>
A22.2	Желудочно-кишечная форма сибирской язвы
A22.7	Сепсис сибирской язвы
A22.8	Другие формы сибирской язвы <i>менингит сибиреязвенный</i>
A22.9	Сибирская язва неуточнённая

В **МКБ-11** все эти формы объединены в один код – 1B97:

Сибирская язва
Сибиреязвенная инфекция
Кожная форма сибирской язвы
Сибирская язва
Злокачественная пустула кожи, вызванная сибирской язвой
Злокачественный карбункул кожи, вызванный сибирской язвой
Лёгочная форма сибирской язвы
Пневмония, вызванная сибирской язвой

Сибиреязвенная пневмония

Пневмония при сибирской язве

Респираторная сибирская язва

Ингаляционная форма сибирской язвы

Болезнь Рэгтикера

Болезнь сортировщиков шерсти

Желудочно-кишечная форма сибирской язвы

Сибиреязвенный колит

Сибиреязвенный менингит

Церебральная форма сибирской язвы

Сепсис, вызванный *Bacillus anthracis*, без упоминания о септическом шоке

Сепсис, вызванный *Anthrax*, БДУ

Сепсис, вызванный *Bacillus anthracis*

Сибиреязвенный сепсис

Сепсис, вызванный *Bacillus anthracis*, с септическим шоком

18

ЛЕЧЕНИЕ

Когда появится желвак или твёрдая опухоль, то проколите её иглой вокруг и посередине до здорового места, пока не появится кровь, после чего натирайте нашатырём, смешанным с табаком, или присыпьте нашатырём и приложите листовой табак, примачивая больное место спиртом или простым вином, настоящим на камфоре. Можно приложить китайский пластырь "сцын-дин-дзи", состоящий из корней зундура, шудана, рюда, агуса, мерха, харагогуля, серанчюгуля и мусы...^{<1>}

Такой состав рекомендовали в Иркутской губернии (Сибирь, Россия) для лечения сибирской язвы в 1809 году. До эры антибио-

¹ ГАТО. Ф. И-7. Оп. 1. Д. 79. Л. 99об, 100–100об, 101–101об; по Темплинг В. Я. *Сибирская язва в традиционной культуре русских крестьян Западной Сибири*, в *Уральский сборник. История. Культура. Религия. Вып.2*. Екатеринбург, 1998, 242–257 с.

тиков чего только не использовали, даже синегнойную палочку (*Pseudomonas aeruginosa*), чьи токсины должны были привести к гибели сибиреязвенного микроба. По крайней мере *in vitro* (на чашке Петри) это работало¹. Однако из всех препаратов, предложенных в это время, до настоящего дня находит своё применение только антисибиреязвенный иммуноглобулин, предложенный² в 1895 году независимо Акилле Склаво³ и Эмилем Маршу⁴.

Эра антибиотиков началась с опытов Александра Флеминга⁵, который заметил антимикробную активность грибка *Penicillium notatum* по отношению к *Staphylococcus aureus*⁶. Из синтезируемого грибом вещества был получен препарат Penicillin, активный в отношении грамположительных бактерий, включая сибиреязвенный микроб. Однако к началу Второй мировой войны серийное производство ещё не было налажено, а основные исследования препарата велись в Великобритании под руководством Говарда Флоры⁷.

В 1942 году в СССР было принято решение наладить производство собственного препарата из грибка Флеминга, для чего по линии Народного комиссариата здравоохранения СССР (Наркомздрава СССР) был отправлен запрос в Великобританию, а в стенах Всесоюзного института экспериментальной медицины (Москва) создана Экспериментально-производственная лаборатория в составе Отдела химии микробов и иммунитета, возглавляе-

¹ 菊池 齊: 緑膿菌と脾脱疽菌との関係,並に緑膿菌類似菌に関する研究, 博士論文, 1928, 11-30.

² Sclavo A. *Sulla preparazione del siero anticarbonchioso (memoria 2.)*. Roma: Tipog. delle Mantellate, 1895, 5 p.; Marchoux É. *Sérum anticharbonneux*. Ann. Inst. Pasteur. 1895; 9:785-810.

³ Achille Sclavo, 1861-1930; итальянский врач, бактериолог, гигиенист. В 1904 году на своей вилле на окраине города Сиена основал Институт по производству сывороток и вакцин (Istituto Serum e Vaccino Produzione).

⁴ Émile Marchoux, 1862-1943; французский врач, бактериолог. Член Национальной академии медицины. В 1907 году основал Общество тропической медицины (Société de pathologie exotique).

⁵ Sir Alexander Fleming, 1881-1955; британский врач, бактериолог. Лауреат Нобелевской премии по физиологии или медицине (1945). Член Лондонского королевского общества (1943).

⁶ Fleming A. *On the antibacterial action of cultures of a Penicillium, with special reference to their use in the Isolation of B. influenzae*. Br J Exp Pathol. 1929; 10(3):226-236.

⁷ Sir Howard Walter Florey, 1898-1968; австралийский врач. Лауреат Нобелевской премии по физиологии или медицине (1945). Член Лондонского королевского общества (1941).

мого Зинаидой Виссарионовной Ермольевой¹. Лаборатория была организована в одной из коммунальных комнат, расположенных во флигеле на территории института, чтобы исключить вероятность попадания спор в препараты, изготавливаемые для фронта. Первоначально она состояла только из вновь принятой на должность младшего научного сотрудника Тамары Иосифовны Балезиной², имевшей на руках годовалого сына, которого не с кем было оставить, и добровольцев – детей сотрудников института. *«Каждый рабочий день, – вспоминает Тамара Иосифовна, – Зинаида Виссарионовна начинала звонком в Наркомздрав профессору В. В. Парину с вопросом: "Есть ли сведения из Англии?". Но ответ был неутешительным. Устав от напрасного ожидания, весной 1942 г. я с помощью друзей стала собирать плесени из самых различных источников»³*. Отношение окружающих, включая и саму Зинаиду Виссарионовну, к этой самостоятельности было весьма скептическое и даже ироничное, поскольку все знали о бесчисленных безуспешных попытках Говарда Флори выделить собственный грибок, продуцирующий пенициллин. Однако настойчивость и энтузиазм Тамары Иосифовны и присоединившейся к её работе лаборантки Нины Ивановой (второго сотрудника) дали свои плоды: 15-й исследованный штамм оказался способным продуцировать вещество, подавляющее рост микроорганизмов, пусть и очень слабо.

Вскоре лаборатория пополнилась новыми сотрудницами – лаборантками Зоей Афанасьевой и Верой Минкевич. Вдохновлённые положительным результатом, они решают выделять споры плесневых грибков из воздуха, модифицировав метод Андрея Львовича Курсанова⁴ путём замены смоченного медным купоросом картофеля на картофельные очистки (*«по военному времени»*). Выделенный

¹ 1897/1898–1974; российский и советский врач, бактериолог, эпидемиолог. Член Академии медицинских наук СССР. Лауреат Сталинской премии (1943). Автор работ по чуме и холере, соавтор советских пенициллина и интерферона.

² 1913–2010; советский и российский врач, бактериолог, вирусолог. Соавтор советских пенициллина и интерферона.

³ Балезина Т. И. *К истории открытия отечественного пенициллина. Антибиотики и химиотерапия.* 1994; 39(1):29–32.

⁴ 1902–1999; советский и российский биохимик. Член Академии наук СССР (1953) и Всесоюзной академии сельскохозяйственных наук имени В. И. Ленина (1985). Герой Социалистического труда (1969).

из воздуха бомбоубежища жилого дома штамм № 93, идентифицированный Андреем Львовичем как «близкий к *Penicillium crustosum*»², обладал даже большей антимикробной активностью, чем *Penicillium notatum* (Рис. 18.1).

Примерно в это же время из Лондона приходит сообщение о прекращении работ по пенициллину и предложение обратиться в США, поскольку из-за отсутствия финансирования Говард Флори перевёз работы туда, однако в этом уже не было нужды: советский пенициллин, по рекомендации Вольфа Александровича Дорфмана³, уже успел даже пройти первые испытания на 18 пациентах с тяжёлыми флегмонами, проходящих

лечение в Центральной поликлинике Наркомздрава СССР. Среди первых пациентов был и муж Тамары Иосифовны, Степан Афанасьевич Балезин⁴, у которого на фоне ожога, полученного на передовой при испытании боевой техники, развилась трофическая язва. В дальнейшем, не без сложностей, были проведены клинические



Рис. 18.1. Культуральный флакон (матрац) с грибом *Penicillium notatum* на 4-е сутки культивирования (собрание Государственного центрального музея современной истории России ГЦМСИР. Ф 479. ГИК 48575/4. С. 40)¹

¹ Данная фотография, обнаруженная в диссертации Тамары Иосифовны Балезиной, является единственной сохранившейся, на которой запечатлён грибок.

² Ермольева З. В. *Пенициллин*, М.: Наркомздрав, Гос. изд-во мед. лит., Медгиз, 1946, 153 с.

³ 1900–1965; российский и советский биолог, биохимик. Автор работ по биологии развития. Осуждён на 10 лет за помощь с устным переводом во время официального визита американско-британской делегации во главе с Говардом Флори в СССР в 1944 году.

⁴ 1904–1982; российский и советский химик, педагог. Заслуженный деятель науки РСФСР (1964). Лауреат Сталинской премии третьей степени (1946). Автор учебников по химии, работ по ингибиторам коррозии металлов.

Уважаемой маме
Иосифовна!

Весь наш батальон пишет письма
Вам благодарить за спасение
жизни нашей от бывшего
безнадежного рвеного Мань-
Кекина. Рвеновский сказал
машинисту уйефаме. У нас
уже 2 рвенова в батальоне

живем с сердцем. Рвенов
хочет Вас увидеть нас
еще не знаю когда, ему
предложили полного курса
для 1-го рвеного Мань-Кекина
и для рвенова Рвенова
взрывать мина.

с Уважением к Вам
и большому благодарности
28.2.43 М. Пугачев

В. Рвеновский и сестры Рвеновский
всегда добры и во всем.

Рис. 18.2. Письмо с фронта ►

испытания препарата¹ и налажено его производство. За годы Великой Отечественной войны советский «пенициллин-крустозин» спас сотни тысяч солдат (Рис. 18.2).

Несмотря на ошеломительный успех первого антибиотика, в скором времени появились сведения о способности *B. anthracis* синтезировать собственную β-лактамазу (пенициллиназу)^{<2>}, то есть резистентности возбудителя к действию препарата. К настоящему моменту, однако, установлено, что естественная устойчивость встречается редко, а неудачи в применении пенициллина обусловлены неадекватной терапией, в частности, использованием малых доз препарата при низкой доступности препарата в макрофаги. Тем не менее пенициллин редко используют на практике, предпочитая в качестве *этиотропной терапии* антибиотики иных фармакологических групп. При этом следует помнить о необходимости использования персоналом специальной защитной одежды, а именно противочумного костюма III типа, состоящего из косынки (шлема), перчаток (удлинённых) и противочумного халата (комбинезона)³. Защиты органов дыхания не предусмотрено, поскольку, как говорилось ранее, споры возбудителя прилипают к альвеолярному эпителию и не выделяются с дыханием во внешнюю среду, однако поскольку сибиреязвенный микроб всё чаще преподносит сюрпризы следует задуматься о возможности использования хотя бы медицинской маски, тем более что её ношение значительно

◀ «Уважаемая Тамара Иосифовна! Весь наш эвакогоспиталь приносит Вам благодарность за спасение жизни нашего септического безнадежного раненого Малькевича. Пенициллин оказал магическое действие. У нас еще 2 раненых в таком же /тяжелом состоянии. Очень прошу Вас снабдить нас еще пенициллином, для проведения полного курса для 1го раненого Малькевича и двух раненых Рябова и Евдокимова. /с Уважением к Вам / и большой благодарностью / 28.X 43 М. Потемкин / О результатах и действии Вашего препарата / будет доложено на хир. обществе». Любезно предоставлено Александром Степановичем Балезиным, сыном Тамары Иосифовны

¹ Перед тем, как передать синтезированный препарат в клинику, сотрудники лаборатории испытывали его безвредность на себе.

² Barnes J. M. *Penicillin and B. anthracis*. J Pathol Bacteriol. 1947; 59(1–2):113–125; DOI: 10.1002/path.1700590113.

³ Подробнее о противочумных костюмах читайте в Главе 28 Оперы о чуме.

снизит риск распространения инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи («внутрибольничных» инфекций).

После регистрации первого случая сибирской язвы у животных стадо изолируют и трижды в день не менее 2 недель регулярно осматривают¹ на предмет появления признаков болезни: повышения температуры, учащения дыхания, отёка подчелюстной пазухи. В случае выявления болезни у конкретного животного оно подлежит изоляции и лечению. Как правило, в полевых условиях на начальных стадиях заболевания применяют комбинацию 20 000 МЕ/кг бензилпенициллина (пеницилина G) внутривенно и 22 000 МЕ/кг прокаин-бензилпенициллина внутримышечно² каждые 12 часов в течение 2 дней. Затем дозы изменяют на 22 000 и 44 000 МЕ/кг соответственно каждые 24 часа в течение последующих 3 дней. Возможно применение окситетрациклина, который первые дни вводят в дозировке 5 мг/кг внутримышечно каждые 12 часов, затем – 10 мг/кг внутримышечно каждые 24 часа. Важно понимать, что в ряде стран лечение больных животных запрещено: они подлежат немедленному убою (чаще всё стадо) и сжиганию, хотя ранее практиковалось их захоронение в так называемых *скотомогильниках*, о которых подробнее поговорим в следующей главе.

Контактным людям назначается профилактическое лечение, включающее введение антисибиреязвенного иммуноглобулина (при наличии) и антибиотиков (наблюдение ведётся 14 дней). Дозировки для детей и взрослых (исключая беременных) приведены в **Табл. 18.1** (препараты первой линии выделены **жирным**). При выборе препарата следует учитывать данные тестирования на антибиотикорезистентность, которое осуществляется в отношении выделенной культуры возбудителя (однако не забываем, что антибиотикотерапия назначается **сразу** при подозрении на заболевание, однако после получения данных об антибиотикорезистентности схему лечения корректируют). В ряде стран рекомендуют проводить вакцинацию (неживой вакциной) на 1-й и 4-й неделе профилактического лечения (за исключением беременных женщин).

¹ В случае невозможности проведения данного мероприятия или вероятности стрессирования животных, последних подвергают антибиотикотерапии препаратом длительного действия.

² Внутривенное применение препарата может привести к гибели животного!

На первый взгляд **Табл. 18.1** может показаться сложной и непонятной, однако после знакомства с графой «Примечание» внизу таблицы всё становится понятно. Рассмотрим на примере препарата омадациклин. Он написан обычным шрифтом (не жирным), следовательно, является препаратом второй линии (т. е. тем, который следует применить, когда препараты первой линии оказались неэффективны или когда к ним установлена резистентность). Согласно классификации антибиотиков AWaRe¹ он относится к группе «резерв» («Re» в верхнем регистре рядом с названием). Чуть ниже имеется упоминание, что в ряде стран его не рекомендуют к применению. Так, например, он не рекомендован в России и США. Вводят его перорально (per os) – 0,3 г каждые 12 часов (дважды в

¹ WHO AWaRe classification of antibiotics for evaluation and monitoring of use, 2023. In: *The selection and use of essential medicines 2023: Executive summary of the report of the 24th WHO Expert Committee on the Selection and Use of Essential Medicines*, 24–28 April 2023. Geneva: World Health Organization; 2023 (WHO/MHP/HPS/EML/2023.04).

Термины: Группа «**доступные**» включает антибиотики, обладающие активностью против широкого спектра часто встречающихся чувствительных патогенов, а также обладающие меньшим потенциалом развития резистентности, чем антибиотики других групп. Группа «**наблюдение**» включает группы (классы) антибиотиков с более высоким потенциалом развития резистентности, включая большинство наиболее приоритетных препаратов из списка критически важных противомикробных препаратов для медицины человека и/или антибиотиков с относительно высоким риском формирования бактериальной резистентности. Эти препараты должны быть приоритетными в качестве ключевых объектов программ управления и мониторинга. Отдельные антибиотики из группы рекомендуются в качестве основных препаратов первого или второго выбора для эмпирической терапии ограниченного числа специфических инфекционных синдромов и включены в качестве отдельных препаратов в Примерные перечни основных лекарственных средств ВОЗ. Группа «**резерв**» включает антибиотики и группы (классы) антибиотиков, которые следует резервировать для лечения подтвержденных или предполагаемых инфекций, вызванных полирезистентными микроорганизмами. Антибиотики резервной группы следует рассматривать как средства «крайней меры». Отдельные антибиотики группы включаются в Примерные перечни основных лекарственных средств ВОЗ в качестве отдельных препаратов, если они имеют благоприятный профиль риска и пользы и доказанную активность против «критически приоритетных» или «высокоприоритетных» патогенов, определенных в Перечне приоритетных патогенов ВОЗ, в частности, энтеробактерий, устойчивых к карбапенемам. Эти антибиотики должны быть доступны, но их применение должно быть адаптировано к конкретным пациентам и конкретным условиям, когда все альтернативные варианты неэффективны или не подходят. Эти препараты могут быть защищены и стать приоритетными в качестве ключевых целей национальных и международных программ управления, включающих мониторинг и отчетность об использовании, для сохранения их эффективности.

сутки) 7 дней в неделю (т. е. «Д/К/П» из примечания), однако первые 2 дня используют дозу 0,45 г (на это указывает «*»). Тут же указано, что детям старше 8 лет вводят по 0,45 г в течение 2 дней, затем по 0,3 г (при этом детям младше 8 лет назначать омадациклин нельзя).

Табл. 18.1. Схема профилактической антибиотикотерапии

Препарат	Способ применения	Схема лечения (Д/К/П)
<i>Л и н к о з а м и д ы</i>		
Клиндамицин ^А (не рекомендуется к применению в некоторых странах)	per os	0,4* / 2 / 5 *детям по 10 мг/кг (max 600 мг/доза) каждые 8 часов
<i>Л и п о г л и к о п е п т и д ы</i>		
Далбаванцин ^{Re} (не рекомендуется к применению в некоторых странах)	в/в	1 г, после чего 0,5 г еженедельно* *детям от 3 месяцев до 6 лет по 22,5 мг/кг (max 1,5 г/доза) каждые 2 недели; детям старше 6 лет по 18 мг/кг (max 1,5 г/доза) каждые 2 недели
<i>М а к р о л и д ы</i>		
Кларитромицин ^{Wa} (не рекомендуется к применению в некоторых странах)	per os	0,5* / 2 / N** *детям по 7,5 мг/кг (max 500 мг/доза) **назначается после 3 дней лечения иным препаратом
<i>О к с а з о л и д и н о ы</i>		
Линезолид ^{Re,*} *требуется контроль миелосупрессии и нейротоксичности в течение 14–28 дней (не рекомендуется к применению в некоторых странах)	per os	0,6* / 2 / 5 *детям до 12 лет по 10 мг/кг (max 600 мг/доза) каждые 8 часов; детям старше 12 лет по 0,6 г

Препарат	Способ применения	Схема лечения (Д/К/П)
<i>Пенициллины</i>		
(не применяются в случае подозрения на заражение резистентным штаммом)		
Амоксициллин^А (не рекомендуется к применению в некоторых странах)	per os	1* / 3 / 5 *детям по 25 мг/кг (max 500 мг/доза)
Ампициллин^А	per os	0,5 / 4 / 5
		1 / 3 / 5
Феноксиметилпенициллин (Пенициллин V)^А (не рекомендуется к применению в некоторых странах)	per os	0,5* / 4 / 5 *детям по 12,5–18,7 мг/кг (max 500 мг/доза)
		1 / 3 / 5
<i>Рифампицины</i>		
Рифампицин^{Wa}	per os	0,3 / 2 / 5
<i>Тетрациклины</i>		
Доксициклин^{А,*} *рекомендуется в качестве препарата первого выбора; у детей до 8 лет имеется риск стойкого изменения цвета зубов	per os	0,1* / 2 / 7 *детям с массой тела до 45 кг по 2,2 мг/кг (max 100 мг/доза); детям с массой тела > 45 кг по 0,1 г
		0,2 / 1 / 7
Миноциклин^{Wa}	per os	0,1* / 2 / 7 *двойная доза на первый приём; детям 4 мг/кг (max 200 мг/доза) затем по 2 мг/кг (max 100 мг/доза)
Омадациклин^{Re} (не рекомендуется к применению в некоторых странах)	per os	0,3* / 1 / 7 *0,45 г первые два дня; детям старше 8 лет по 0,45 г в течение 2 дней, затем по 0,3 г

Препарат	Способ применения	Схема лечения (Д/К/П)
Тетрациклин ^А	per os	0,5* / 4 *детям по 12,5 мг/кг (max 500 мг/доза)
<i>Фторхинолоны</i>		
Левифлоксацин ^{Wa}	per os	0,5* / 1 / 5 *детям с массой тела до 50 кг по 8 мг/кг (max 250 мг/доза) каждые 12 часов; детям с массой тела > 50 кг по 0,5 г
Моксифлоксацин ^{Wa} (не рекомендуется к применению в некоторых странах)	per os	0,4* / 2 / 5 *детям с 3 до 23 мес по 6 мг/кг (max 200 мг/доза); с 2 до 6 лет по по 5 мг/кг (max 200 мг/доза); с 6 до 12 лет по по 4 мг/кг (max 200 мг/доза); старше 12 лет по по 4 мг/кг (max 200 мг/доза) или 0,4 г
Офлоксацин ^{Wa} (не рекомендуется к применению в некоторых странах)	per os	0,2–0,4* / 2 / 5 *детям по 11,25 мг/кг (max 400 мг/доза)
Пефлоксацин ^{Wa}	per os	0,4 / 2 / 5
Ципрофлоксацин ^{Wa}	per os	0,25–0,5* / 2 / 5 *детям по 15 мг/кг (max 500 мг/доза)
<i>Антисибирезвенный иммуноглобулин</i> (ввиду наличия возможных побочных эффектов за час до применения рекомендуется введение дифенгибрамина внутривенно или per os)		
Раксibaкумаб	в/в	40* мг/кг (однократно) *детям с массой тела до 10 кг по 80 мг/кг; детям с массой тела от 10 до 40 кг по 60 мг/кг; детям с массой тела > 40 кг по 40 мг/кг

Препарат	Способ применения	Схема лечения (Д/К/П)
Обилтоксаксимаб	в/в	16* мг/кг (однократно) * детям с массой тела до 15 кг по 32 мг/кг; детям с массой тела от 15 до 40 кг по 24 мг/кг; детям с массой тела > 40 кг по 16 мг/кг
Примечание: в/в – внутривенно; per os – перорально Д – разовая доза, г; К – кратность применения, сут.; П – продолжительность курса, дни.		

У больных при кожной форме сибирской язвы (без признаков менингита) антибиотикотерапия, как правило, осуществляется 7 дней, но в зависимости от состояния может быть значительно продлена. Дозировки для взрослых (исключая беременных) приведены в Табл. 18.2 (препараты первой линии выделены **жирным**). Возможно применение антисибиреязвенного иммуноглобулина, который, в зависимости от степени тяжести, вводят в дозе 20–100 мл внутримышечно или по схеме, рекомендованной для профилактического лечения.

В случае системного распространения инфекции (т. е. иных форм, включая менингеальную), возможно применение иной схемы лечения¹, предусматривающей большие дозы и длительное применение (Табл. 18.3.1; препараты первой линии выделены **жирным**), или комбинирование препаратов при стандартной антибиотикотерапии в 7 дней (Табл. 18.3.2).

¹ Помимо этого в настоящее время ведутся активные поиски новых препаратов. Так, например, в опытах на кроликах подтверждена эффективность тейксобактина в лечении ингаляционной формы сибирской язвы (см. Lawrence W. S., Peel J. E., et al. Teixobactin provides protection against inhalation Anthrax in the rabbit model. Pathogens. 2020; 9(9):773; DOI: 10.3390/pathogens9090773).

Табл. 18.2. Схема антибиотикотерапии (монотерапия) при кожной форме

Препарат	Способ применения	Схема лечения (Д/К)
<i>Аминогликозиды</i>		
Амикацин ^А	в/м	0,5 / 2
Гентамицин ^А	в/м	0,08 / 3
<i>Амфениколы</i>		
Хлорамфеникол	в/в	70–100* / 1 *мг/кг
<i>Карбапенемы</i>		
Меропенем ^{Wа} (не рекомендуется к применению в некоторых странах)	в/в	2* / 3 *детям по 20 мг/кг (max 2 г/доза)
<i>Липогликопептиды</i>		
Далбаванцин ^{Re} (не рекомендуется к применению в некоторых странах)	в/в	1 г, после чего 0,5 г* еженедельно *детям от 3 мес. до 6 лет по 22,5 мг/кг (max 1,5 г/доза); детям старше 6 лет по 18 мг/кг (max 1,5 г/доза)
<i>Макролиды</i>		
Кларитромицин ^{Wа,*} *неэффективен в случае бактериемии (не рекомендуется к применению в некоторых странах)	per os	0,5* / 2 / N** *детям по 7,5 мг/кг (max 500 мг/доза) **назначается после 3 дней лечения иным препаратом

Препарат	Способ применения	Схема лечения (Д/К)
<i>О к с а з о л и д и н о н ы</i>		
Линезолид ^{Re,*} *требуется контроля миелосупрессии и нейротоксичности в течение 14–28 дней (не рекомендуется к применению в некоторых странах)	per os	0,6* / 2 *детям до 12 лет по 10 мг/кг (max 600 мг/доза) каждые 8 часов; детям старше 12 лет по 0,6 г
<i>П е н и ц и л л и н ы</i> (не применяются в случае подозрения на заражение резистентным штаммом)		
Амоксициллин ^A (не рекомендуется к применению в некоторых странах)	per os	1* / 3 *детям с массой тела до 20 кг по 25–40 мг/кг; с массой тела > 20 кг по 0,5 г
Ампициллин ^A (не рекомендуется к применению в некоторых странах)	per os	0,5 / 4
Бензилпенициллин (пенициллин G) ^A	в/м	1* / 4 *млн ЕД; детям массой тела до 20 кг прокаин-бензилпенициллин по 12500–25000 ЕД/кг дважды в сутки
Феноксиметилпенициллин (Пенициллин V) ^A (не рекомендуется к применению в некоторых странах)	per os	0,5* / 4 *детям по 12,5–18,7 мг/кг (max 500 мг/доза)
<i>Р и ф а м п и ц и н ы</i>		
Рифампицин ^{Wa}	per os	0,45 / 2

Продолжение Табл. 18.2

Препарат	Способ применения	Схема лечения (Д/К)
<i>Тетрациклины</i>		
Доксициклин^{А,*} *у детей до 8 лет имеется риск стойкого изменения цвета зубов	per os	0,1–0,2* / 2 *детям с массой тела до 45 кг по 2,2 мг/кг (max 100 мг/доза); детям с массой тела > 45 кг по 0,1 г
Миноциклин^{Wa}	per os	0,1* / 2 *двойная доза на первый приём; детям 4 мг/кг (max 200 мг/доза) затем по 2 мг/кг (max 100 мг/доза)
Омадациклин^{Re} (не рекомендуется к применению в некоторых странах)	per os	0,3* / 1 / 7 *0,45 первые два дня; детям старше 8 лет по 0,45 г в течение 2 дней, затем по 0,3 г
Тетрациклин^А	per os	0,5* / 4 *детям по 12,5 мг/кг (max 500 мг/доза)
<i>Трициклические гликопептиды</i>		
Ванкомицин^{Wa} (не рекомендуется к применению в некоторых странах)	в/в	15* / 2 *мг/кг; детям по 20 мг/кг каждые 8 часов (вводить в течение 1–2 часов)
<i>Фторхинолоны</i>		
Левифлоксацин^{Wa}	per os	0,75* / 1 *детям с массой тела до 50 кг по 8 мг/кг (max 250 мг/доза) каждые 12 часов; детям с массой тела > 50 кг по 0,75 г

Препарат	Способ применения	Схема лечения (Д/К)
Моксифлоксацин ^{Wa} (не рекомендуется к применению в некоторых странах)	per os	0,4* / 1 *детям с 3 до 23 мес. по 6 мг/кг (max 200 мг/доза); с 2 до 6 лет по 5 мг/кг (max 200 мг/доза); с 6 до 12 лет по 4 мг/кг (max 200 мг/доза); старше 12 лет по 4 мг/кг (max 200 мг/доза) или 0,4 г
Офлоксацин ^{Wa} (не рекомендуется к применению в некоторых странах)	per os	0,2* / 3 *детям по 11,25 мг/кг (max 400 мг/доза) каждые 12 часов
		0,4 / 2
Пефлоксацин ^{Wa}	per os	0,4 / 2
Ципрофлоксацин ^{Wa}	per os	0,25–0,75* / 2 *детям по 15 мг/кг (max 500 мг/доза)
Примечание: в/м – внутримышечно; в/в – внутривенно; per os – перорально Д – разовая доза, г; К – кратность применения, сут.; П – продолжительность курса, дни.		

Табл. 18.3.1. Схема антибиотикотерапии (монотерапия) при системном течении инфекции

Препарат	Способ применения	Схема лечения (Д/К/Пmin)
<i>А м и н о г л и к о з и д ы</i>		
Амикацин ^A	в/м в/в	0,5 / 2 / 10

Продолжение Табл. 18.3.1

Препарат	Способ применения	Схема лечения (Д/К/Пmin)
Гентамицин ^А	в/м в/в	0,16 / 2–3 / 10
<i>Макролиды</i>		
Эритромицин ^{Wa}	per os	0,5* / 4 / 10 *детям по 30–50 мг/кг
<i>Пенициллины</i> (не применяются в случае подозрения на заражение резистентным штаммом)		
Амоксициллин ^А	per os	0,5*/3/14 *детям с массой тела до 20 кг по 40 мг/кг (в три приёма); с массой тела > 20 кг по 0,5 г
Ампициллин ^А	в/м	2–3 / 4 / 14
	в/в	2–2* / 4–6 / 14 *детям по 50–200 мг/кг
Бензилпенициллин (пенициллин G) ^А	в/м	1* / 6 / 14–21
	в/в	*млн ЕД; детям по 300000–400000 ЕД/кг
Прокаин-бензилпенициллин ^А	в/м	0,6–1,2* / 4 / 14–21 *млн ЕД 25000–50000 ЕД/кг
Феноксиметилпенициллин (Пенициллин V) ^А (не рекомендуется к применению в некоторых странах)	per os	0,5* / 4 / 14–21 *детям по 25–50 мг/кг
	в/в	4* / 4 / 14–21 *млн ЕД

Препарат	Способ применения	Схема лечения (Д/К/Пmin)
<i>Р и ф а м п и ц и н ы</i>		
Рифампицин^{Wa,*} *не рекомендуется для монотерапии	в/м в/в	0,3 / 2 / 14–21
<i>Т е т р а ц и к л и н ы</i>		
Доксициклин^{A,*} *у детей до 8 лет имеется риск стойкого изменения цвета зубов	в/в	0,2* / 2 / 10–14 *детям до 8 лет по 2,2 мг/кг (в экстренных случаях); с массой тела до 45 кг по 2,2 мг/кг; с массой тела > 45 кг по 0,1 г
<i>Ф т о р х и н о л о н ы</i>		
Пефлоксацин ^{Wa}	в/в	0,4 / 2 / 10
Ципрофлоксацин^{Wa,*} *при тяжёлых случаях с аллергией на пенициллины возможно применение в комбинации с амоксициллином, ампициллином, а также хлорамфениколом ^A и левофлоксацином ^{Wa} (Табл. 18.2)	per os	0,5 / 2 / 10
	в/в	0,2–0,4 / 2 / 10
Примечание: в/м – внутримышечно; в/в - внутривенно Д – разовая доза, г; К – кратность применения, сут; Пmin – продолжительность курса (минимальная), дни.		

Табл. 18.3.2. Схема антибиотикотерапии (комбинированная) при системном течении инфекции

Препарат (основной)	Схема лечения (Д/К) Способ примене- ния	Препарат (комбинация)	Схема лечения (Д/К) Способ примене- ния
<i>Первая линия</i>			
<i>Карбапенемы</i>		<i>Ингибитор синтеза белка</i>	
Меропенем ^{Wa} (не рекомендуется к применению в некото- рых странах)	2* / 3 в/в *детям по 40 мг/кг (max 2 г/доза)	Миноциклин ^{Re}	0,1* / 2 *двойная доза на первый приём; детям 4 мг/кг (max 200 мг/доза), затем по 2 мг/кг (max 100 мг/доза) в/в
<i>Пенициллины</i> (не применяются в случае подозрения на заражение резистентным штаммом)			
Ампициллин ^A (не рекомендуется к применению в некото- рых странах)	2* / 6 *детям по 50 мг/кг (max 3 г/доза) каж- дые 6 часов в/в	Доксицик- лин ^{A,*,**} *у детей до 8 лет имеется риск стойко- го изменения цвета зубов **предполагается эффективность при менингите в комби- нациях с фторхино- лонами	0,1* / 2 *двойная доза на первый приём; детям с массой тела до 45 кг 2,2 мг/кг (max 200 мг/доза), затем по 2,2 мг/кг (max 100 мг/доза); детям с массой тела > 45 кг 0,2 г, затем по 0,1 г в/в
Бензилпеницил- лин (пенициллин G) ^A	4* / 6 *млн ЕД; детям 60000 ЕД/кг (max 4 млн ЕД/доза) в/в		

<p>Препарат (основной)</p>	<p>Схема лечения (Д/К) Способ применения</p>	<p>Препарат (комбинация)</p>	<p>Схема лечения (Д/К) Способ применения</p>
<p><i>Фторхинолоны</i></p>			
<p>Левифлоксацин^{Wa}</p>	<p>0,5* / 2 *детям с массой тела до 50 кг по 10 мг/кг (max 250 мг/доза); детям с массой тела > 50 кг по 0,75 г каждые 24 часа в/в</p>		
<p>Ципрофлоксацин^{Wa}</p>	<p>0,4* / 3 *детям по 10 мг/кг (max 400 мг/доза) в/в</p>		
<p><i>Комбинированные (для детей препараты второй линии)</i></p>			
<p>Имипенем + циластатин^{Wa}</p>	<p>1* / 4 *детям по 25 мг/кг (max 1 г/доза) в/в</p>		
<p>Ампициллин + сульбактам^A</p>	<p>3* / 4 *детям по 50 + 25 мг/кг (max 2 + 1 г/доза) в/в</p>		

Препарат (основной)	Схема лечения (Д/К) Способ применения	Препарат (комбинация)	Схема лечения (Д/К) Способ применения
Пиперациллин + тазобактам* <i>*не применяется для взрослых</i>	0,75 + 0,1* / 4 <i>*max 4 + 0,5</i>		
<i>Вторая линия</i>			
<i>Трициклические гликопептиды</i>		<i>Ингибитор синтеза белка</i>	
Ванкомицин ^{Wa} (не рекомендуется к применению в неко- торых странах)	15* / 2** *мг/кг; детям по 20 мг/кг каж- дые 8 часов (пациентам в критическом состоянии допустимо увеличение дозы до 20–35 мг/кг) *вводить в течение 1–2 часов в/в	Клиндамицин ^A (не рекомендуется к применению в неко- торых странах)	0,9* / 3 *детям по 12,3 мг/кг (max 900 мг/доза) в/в
		Линезолид ^{Re,*} *требуется контроль миелосупрессии и нейротоксичности в течение 14–28 дней (не рекомендуется к применению в неко- торых странах)	0,6* / 2 *детям до 12 лет по 10 мг/кг (max 600 мг/доза) каждые 8 часов; старше 12 лет по 15 мг/кг (max 600 мг/доза) в/в

Препарат (основной)	Схема лечения (Д/К) Способ применения	Препарат (комбинация)	Схема лечения (Д/К) Способ применения
<i>Фторхинолоны</i>			
Моксифлоксацин ^{Wa} (не рекомендуется к применению в некоторых странах)	0,4* / 1** *детям с 3 до 23 мес. по 6 мг/кг (тах 200 мг/доза); с 2 до 6 лет по 5 мг/кг (тах 200 мг/доза); с 6 до 12 лет по 4 мг/кг (тах 200 мг/доза); старше 12 лет по 4 мг/кг (тах 200 мг/доза) или 0,4 г **детям каждые 12 часов в/в		
		Омадациклин ^{Re,*} *не применяется для детей (не рекомендуется к применению в некоторых странах)	0,1* / 2 *двойная доза на первый приём в/в
		Хлорамфеникол ^A (не рекомендуется к применению в некоторых странах)	1* / 3–4 *детям по 25 мг/кг (тах 1 г/доза) в/в
		Эравациклин ^{Re} (не рекомендуется к применению в некоторых странах)	1* / 2 *мг/кг; детям старше 8 лет по 1 мг/кг в/в

Препарат (основной)	Схема лечения (Д/К) Способ примене- ния	Препарат (комбинация)	Схема лечения (Д/К) Способ примене- ния
		<i>И н г и б и т о р с и н т е з а Р Н К</i>	
		Рифампицин ^{Wa} (не рекомендуется к применению в некото- рых странах)	0,6* / 2 *детям по 10 мг/кг (max 300 мг/доза) в/в
<p>Для всех препаратов, указанных выше, возможны следующие режимы:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Два основных препарата различных классов и один препарат ингибитор синтеза белка / РНК; (пример: ципрофлоксацин + меропенем + миноциклин) 2. Один основной препарат и один препарат ингибитор синтеза белка; (пример: меропенем + доксициклин) 3. Два основных препарата различных классов; (пример: меропенем + ципрофлоксацин) 4. Один ингибитор синтеза белка и один ингибитор синтеза РНК. (пример: клиндамицин + рифампицин) 			
<i>И н ы е к о м б и н а ц и и</i>			
Ванкомицин ^{Wa,*} *при менингоэнце- фалите (не рекомендуется к применению в неко- торых странах)	1* / 2 *детям по 40 мг/кг в/в	Бензилпеницил- лин (пенициллин G) ^A	1* / 6 / 14–21 *млн ЕД; детям по 300000– 400000 ЕД/кг
Кларитроми- цин ^{Wa,*} *при лёгочной форме	0,5 / 2 per os в/в		

Препарат (основной)	Схема лечения (Д/К) Способ применения	Препарат (комбинация)	Схема лечения (Д/К) Способ при- менения
Клиндамицин ^{А,*} *при лёгочной форме	0,15–0,3* / 4 *детям по 8–25 мг/кг per os 0,6–0,9* / 3–4 *детям по 15–40 мг/кг в/в		
Рифампицин ^{Wа,*} *при менингоэнце- фалите	0,6–1,2* / 2–4 *детям по 10–20 мг/кг per os в/в		
Стрептомицин* *при желудочно- кишечной форме	1* / 1 *детям по 20–40 мг/кг в/м		
Примечание: в/м – внутримышечно; в/в – внутривенно; per os – перорально. Д – разовая доза, г; К – кратность применения, сут.			

Беременным рекомендуется использовать фторхинолоны или с осторожностью иные препараты, за исключением тетрациклина и миноциклина. Препараты вводят во взрослых дозировках, поскольку риск смерти матери и плода¹ превышает риски развития неже-

¹ Большинство зарегистрированных случаев сибирской язвы у беременных без лечения сопровождалось смертью плода, что можно считать косвенным доказательством возможности вертикальной передачи инфекции (см. Meaney-Delman D., Zotti M. E., et al. *Anthrax cases in pregnant and postpartum women: a systematic review*. *Obstet Gynecol.* 2012; 120(6):1439–1449; DOI: 10.1097/aog.0b013e318270ec08).

лательных осложнений от приёма антибиотиков. Грудное вскармливание считается безопасным, поскольку нет достоверных доказательств передачи возбудителя через молоко, однако женщинам стоит воздержаться от кормления грудью на 48 часов после начала антибиотикотерапии.

В случае вероятности преднамеренного заражения (акта биотерроризма), а также аварии при работе с возбудителем пострадавшим, у которых нет симптомов болезни, назначают лечение доксициклином и ципрофлоксацином в течение 6 дней. **Доксициклин**^A детям младше 8 лет или массой тела меньше 45 кг вводят перорально по 2,2 мг/кг препарата дважды в сутки, а детям с массой тела больше 45 кг и беременным женщинам (с осторожностью и при противопоказаниях к другим препаратам) – перорально по 0,1 г препарата дважды в сутки. Взрослым вводят перорально по 0,1–0,3 г препарата трижды в сутки. **Ципрофлоксацин**^{Wa} детям вводят перорально по 10–15 мг/кг (суточная доза не должна превышать 1 г) дважды в сутки. Взрослым и беременным (с осторожностью и при противопоказаниях к другим препаратам) – перорально по 0,5 г также дважды в сутки. **Левифлоксацин**^{Wa} беременным (с осторожностью и при противопоказаниях к другим препаратам) вводят перорально по 0,5 г один раз в сутки. В ситуации, когда возбудитель чувствителен к пенициллинам, в некоторых странах детям и беременным вводят перорально **амоксциллин**^A по 0,5 г трижды в сутки в течение 6 дней. В дополнение к антибиотикотерапии может быть проведена вакцинация неживой вакциной (не рекомендована беременным женщинам¹).

При появлении симптомов кожной формы назначают приём **ципрофлоксацина**^{Wa} или **доксициклина**^A по указанным схемам, а при появлении симптомов лёгочной формы к данным препаратам

¹ В США по результатам наблюдения за младенцами, рождёнными от женщин-военнослужащих, подвергшихся вакцинации, разрешено применение адсорбированной вакцины Biothrax (rPA102) для иммунизации беременных на фоне антибиотикотерапии (см. Wright J. G., Quinn C. P., et al. *Use of anthrax vaccine in the United States: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP)*, 2009. MMWR Recomm Rep. 2010 Jul; 59(RR-6):1–30).

добавляют ещё один-два, желательны других фармакологических групп. Причём ввиду высокого риска летального исхода, который значительно превышает риск осложнений на фоне терапии, беременным и лицам с иммунодефицитными состояниями назначают терапию по схеме для взрослых.

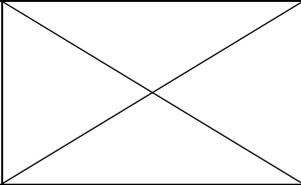
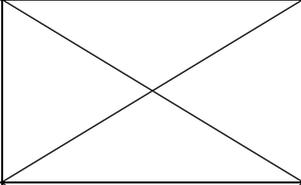
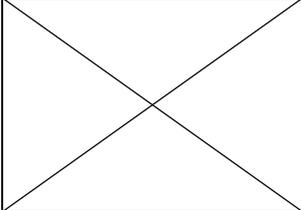
Новорождённым (включая недоношенных), подвергшимся преднамеренному воздействию возбудителя, также целесообразно назначение антисибирезвенного иммуноглобулина и антибиотиков, однако данные о дозировании, существующие на сегодняшний день, являются экстраполяцией сведений, основанных на старшей популяции. Тем не менее в случае чрезвычайной ситуации они могут оказаться полезными (Табл. 18.4 и Табл. 18.5).

Табл. 18.4. Схема антибиотикотерапии новорождённых (преднамеренное заражение)

Препарат	Схема лечения (Д/К) Способ применения (препараты указаны в порядке убывания предпочтительности)	
	Без клинических проявлений	Симптомы кожной формы
<i>Первая линия</i>		
Амоксициллин ^{A,PR} (или ампициллин ^A) (не рекомендуется к применению в некоторых странах)	25 / 3* *недоношенные (до 34-й недели) до 1-й недели жизни каждые 12 часов per os	
Феноксиметилпенициллин (пенициллин V) ^{A,PR} (не рекомендуется к применению в некоторых странах)	25 / 2* *недоношенные старше 1-й недели жизни каждые 8 часов; доношенные младше 1-й недели каждые 8 часов; доношенные старше 1-й недели жизни каждые 6 часов per os	

Продолжение Табл. 18.4

Препарат	Схема лечения (Д/К) Способ применения (препараты указаны в порядке убывания предпочтительности)	
	Без клинических проявлений	Симптомы кожной формы
Бензилпенициллин (пенициллин G) ^{A,PR}	25000* / 2 *Ед в/м	
Амоксициллин + клавулант ^{A,PR} (не рекомендуется к применению в некоторых странах)	25 + 6,2 / 3* *недоношенные (до 34-й недели) до 1-й недели жизни каждые 12 часов *при симптомах кожной формы недоношенные (34–37-я недели) до 1-й недели жизни каждые 12 часов per os	
Ципрофлокса- цин ^{Wa,*} *рекомендуется в качестве препарата первого выбора при симптомах кожной формы	7,5 / 2 per os	10* / 2 *доношенные по 15 мг/кг per os
Клиндамицин ^A (не рекомендуется к применению в некоторых странах)	7* / 3 *доношенные по 9 мг/кг per os	
Доксициклин ^{A,*} *имеется риск стойкого изменения цвета зубов; при симптомах кожной формы приоритетнее клиндамицина	5* / 2 *доношенные начиная со 2-й дозы по 2,5 мг/кг per os	
Левифлоксацин ^{Wa}	10 / 2* *старше 1-й недели каждые 8 часов per os	

Препарат	Схема лечения (Д/К) Способ применения (препараты указаны в порядке убывания предпочтительности)	
	Без клинических проявлений	Симптомы кожной формы
<i>Вторая линия</i>		
Моксифлоксацин ^{Wa} (не рекомендуется к применению в педиат- рии в некоторых странах)	10 / 1 per os	
Линезолид ^{Re,*} *требуется контроля мие- лосупрессии и нейро- токсичности в течение 14–28 дней (не рекомендуется к применению в некоторых странах)	10 / 2* *старше 1-й недели каждые 8 часов per os	
Меропенем ^{Wa} (не рекомендуется к применению в некоторых странах)		20* / 3 * недоношенные (до 34-й недели) до 1-й недели жизни по 13,3 мг/кг в/в
Ванкомицин ^{Wa} (не рекомендуется к применению в некоторых странах)		15* / 3 *первая доза 20 мг/кг; недоношенные (до 34-й недели) каждые 12 часов в/в
Омадациклин ^{Re} (не рекомендуется к применению в педиат- рии в некоторых странах)		3,85* / 1 *первая доза 5,5 мг/кг; только доношенные и недоношенные (34–37-я нед.) старше 1-й нед. жиз. в/в

Препарат	Схема лечения (Д/К) Способ применения (препараты указаны в порядке убывания предпочтительности)	
	Без клинических проявлений	Симптомы кожной формы
Далбаванцин ^{Re} (не рекомендуется к применению в некоторых странах)	X	22,5* / однократно *только доношенные старше 1-й недели жизни в/в
<i>Антибиотический иммуноглобулин</i> (ввиду наличия возможных побочных эффектов за час до применения ре- комендуется введение дифенгибрамина внутривенно или per os)		
Раксibaкумаб	55 / однократно в/в	
Обилтоксаксимаб	16 / однократно в/в	
<p>Примечание:</p> <p>PR – применяется с осторожностью, поскольку не эффективно при заражении пенициллин-резистентным штаммом</p> <p>в/м – внутримышечно; в/в – внутривенно; per os – перорально.</p> <p>Д – разовая доза, мг/кг; К – кратность применения, сут.</p>		

Табл. 18.5. Схема антибиотикотерапии новорождённых (преднамеренное заражение) при системном течении инфекции

Препарат (основной)	Схема лечения (Д/К) Способ применения	Препарат (комбинация)	Схема лечения (Д/К) Способ применения
(препараты указаны в порядке убывания предпочтительности)			
<i>Первая линия</i>			
Ципрофлоксацин ^{Wa}	12,5* / 2 *недоношенные (до 34-й недели) до 1-й недели жизни по 7,5 мг/кг в/в <per os>	<i>Ингибитор синтеза белка</i>	
		Доксициклин ^{A,*} *рекомендуется при симптомах менингита; имеется риск стой- кого изменения цвета зубов	5* / 2 *доношенные начиная со 2-й дозы по 2,5 мг/кг в/в <per os>
Левофлоксацин ^{Wa}	10 / 2* *старше 1-й недели каждые 8 часов в/в		
Меропенем ^{Wa} (не рекомендуется к применению в некоторых странах)	20* / 3 *недоношенные (до 34-й недели) до 1-й недели жизни по 13,3 мг/кг в/в		

<p>Препарат (основной)</p>	<p>Схема лечения (Д/К) Способ применения</p>	<p>Препарат (комбинация)</p>	<p>Схема лечения (Д/К) Способ применения</p>
<p>Бензилпенициллин (пенициллин G)^{A,*},^{PR} *рекомендуется при симптомах менингита</p>	<p>100000 / 8* *недоношенные (до 34-й нед.) до 1-й недели жизни каждые 12 часов; Доношенные и недоношенные (34–37 недель) старше 1 недели жизни каждые 6 часов в/в в/м</p>		
<p>Ампициллин^{A,*},^{PR} *рекомендуется при симптомах менингита (не рекомендуется к применению в некоторых странах)</p>	<p>50* / 3** *недоношенные (до 34-й недели) старше 1-й недели жизни по 75 мг/кг ** недоношенные (до 34 недели) каждые 12 часов в/в в/м</p>		
<p>Ванкомицин^{Wa,*} *запрещено при симптомах менингита (не рекомендуется к применению в некоторых странах)</p>	<p>15* / 3 *первая доза 20 мг/кг; недоношенные (до 34-й недели) каждые 12 часов; необходимо предварительное введение антигипотензивного препарата в/в</p>		

Препарат (основной)	Схема лечения (Д/К) Способ применения	Препарат (комбинация)	Схема лечения (Д/К) Способ применения
<i>В т о р а я л и н и я</i>			
Моксифлоксацин ^{Wa}	10 / 1 в/в	<i>И н г и б и т о р с и н т е з а б е л к а</i>	
		Клиндамицин ^{A,*} *рекомендуется при симптомах менингита (не рекомендуется к применению в некоторых странах)	7* / 3 *доношенные по 9 мг/кг в/в
Имипенем* *при подтверждении менингита используется как препарат первой линии (не рекомендуется к применению в некоторых странах)	25* / 3 *вводить в течение 1,5 часов в/в	Линезолид ^{Re,*} *требуется контроля миелосупрессии и нейротоксичности в течение 14–28 дней (не рекомендуется к применению в некоторых странах)	10 / 2* *старше 1-й недели каждые 8 часов в/в <per os>
Далбаванцин ^{Re} (не рекомендуется к применению в некоторых странах)	22,5* / одно-кратно *только доношенные старше 1-й недели жизни в/в	Омадациклин ^{Re} (не рекомендуется к применению в педиатрии в некоторых странах)	3,85* / 1 *первая доза 5,5 мг/кг; только доношенные и недоношенные (34–37 недель) старше 1-й недели жизни в/в
Ампициллин + сульбактам ^{A,PR} (не рекомендуется к применению в некоторых странах)	50+25 / 2		

Препарат (основной)	Схема лечения (Д/К) Способ при- менения	Препарат (комбинация)	Схема лечения (Д/К) Способ при- менения
		<i>И н г и б и т о р с и н т е з а Р Н К</i>	
		Рифампицин ^{Wa} (не рекомендуется к применению в некоторых странах)	10 / 1 в/в
<p>Для всех препаратов, указанных выше, возможны следующие режимы:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Два основных препарата различных классов и один препарат ингибитор синтеза белка / РНК; (пример: ципрофлоксацин + меропенем + доксициклин) 2. Один основной препарат и один препарат ингибитор синтеза белка; (пример: меропенем + доксициклин) 3. Два основных препарата различных классов; (пример: меропенем + ципрофлоксацин) 4. Два ингибитора синтеза белка (пример: доксициклин + рифампицин) 5. Один ингибитор синтеза белка и один ингибитор синтеза РНК. (пример: клиндамицин + линезолид) 			
<i>А н т и с и б и р е з в е н н ы й и м м у н о г л о б у л и н</i> (ввиду наличия возможных побочных эффектов за час до применения рекомендуется введение дифенгибрамина внутривенно или per os)			
Раксibaкумаб		55 / однократно	в/в
Обилтоксаксимаб		32 / однократно	в/в
<p>Примечание:</p> <p>PR – применяется с осторожностью, поскольку не эффективно при заражении пенициллин-резистентным штаммом</p> <p>в/м – внутримышечно; в/в – внутривенно.</p> <p><> – альтернативный способ введения при невозможности осуществления основного.</p> <p>Д – разовая доза, мг/кг; К – кратность применения, сут.</p>			

В качестве дополнительной терапии, особенно когда штамм проявляет устойчивость к антибиотикам, потенциально могут использоваться *бактериофаги*. Первый бактериофаг, активный в отношении *B. anthracis*, по-видимому, был выделен в 1931 году¹ Филипом Коулзом² из сточных вод. Данный бактериофаг лизировал штаммы сибиреязвенного микроба, а также штаммы картофельной палочки (*B. mesentericus*), которая, как следует из названия, размножается в клубнях картофеля, а при попадании в муку делает мякиш выпеченного хлеба липким, тягучим и зловонным. Им же были поставлены первые опыты³ на мышах, показавшие перспективность применения бактериофагов в лечении сибирской язвы.

Затем, в 1951 году, Элино́р МакКло́й⁴ из старой бульонной культуры атипичного штамма *B. cereus* W выделила⁵ одноимённый бактериофаг. Она заметила, что хотя фаг лизировал штаммы сибиреязвенного микроба и лишь некоторые штаммы *B. cereus*, он был не способен лизировать «гладкие» S-колонии *B. anthracis*. Позднее она пришла к выводу⁶, что выделенный ею фаг существует в двух формах: «основной» Wβ фаг лизирует штаммы *B. anthracis* (но не штамм W), а «мутантный» Wα – штаммы *B. anthracis* и *B. cereus* W (Рис. 18.3). Спустя три года Эрик Брау́н⁷ и Уи́льям Че́рри⁸ выделили третью форму – фаг Wγ, как сами писали, «случайно»⁹. Они показали способность гамма-фага (как его теперь называют) лизи-

¹ Cowles P. B. *A Bacteriophage for B. anthracis*. J Bacteriol. 1931; 21(3):161–166; DOI: 10.1128/jb.21.3.161–166.1931.

² Philip V. Cowles, 1899–1978; американский врач, фаголог, бактериолог.

³ Cowles P. B., Hale M. W. *Effect of bacteriophage on experimental anthrax in white mice*. J Infect Dis. 1931; 49(3):264–269.

⁴ Elinor W. McCloy, ? – ?; британский врач, фаголог.

⁵ McCloy E. W. *Studies on a lysogenic Bacillus strain. I. A bacteriophage specific for B. anthracis*. J Hygiene. 1951; 49(2):114–125; DOI: 10.1017/s0022172400015412.

⁶ McCloy E. W. *Unusual behaviour of a lysogenic Bacillus strain*. J Gen Microbiol. 5:xiv–xvi; McCloy E. W. *Lysogenicity and immunity to Bacillus phage W*. J Gen Microbiol. 1958; 18(1):198–220; DOI: 10.1099/00221287–18–1–198.

⁷ Eric R. Brown, ? – ?; американский военный врач, фаголог.

⁸ William V. Cherry, ? – ?; американский врач, фаголог.

⁹ Brown E. R., Cherry W. B. *Specific identification of Bacillus anthracis by means of a variant bacteriophage*. J Infect Dis. 1955; 96(1):34–39; DOI: 10.1093/infdis/96.1.34.

ровать даже штаммы сибиреязвенного микроба, синтезирующие капсулу, хотя в настоящее время известно, что штамм *B. anthracis* Ames, часто используемый в качестве контрольного, устойчив к действию фага. Трое учёных считали фаги Wα и Wγ «мутантами умеренного фага» Wβ, поскольку они не образовывали бляшки (пятна лизиса) на культуре лизогенного штамма. Это такой штамм, в котором умеренный фаг «сидит» в виде профага, время от времени «выходя» из бактерий, т. е. реализуя литический цикл¹, из-за чего на чашке Петри (для краткости часто говорят просто «на чашке») и формируются бляшки. Однако вполне вероятно, что это были три разных штамма, просто природу бактериофагов в те годы ещё плохо понимали.

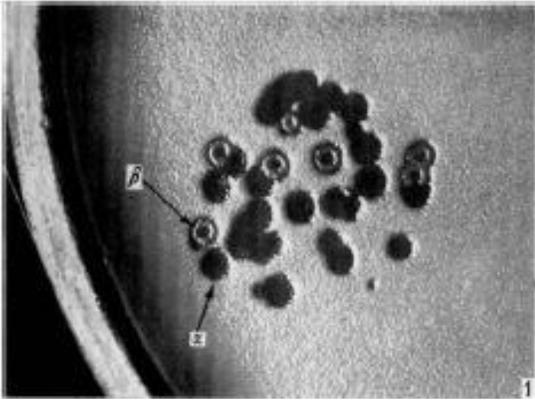


Рис. 18.3. Пятна лизиса на культуре штамма *B. anthracis* Davis (по McCloy E. W., 1958; публикуется с разрешения the Society for General Microbiology, лицензия передана через Copyright Clearance Center, Inc)

В дальнейшем были выделены различные бактериофаги, активные в отношении штаммов сибиреязвенного микроба. Так, фаг AP50 лизирует лишь около 33 % штаммов, но способен лизировать те, что устойчивы к действию гамма-фага, а кишечный фаг червя (Worm

¹ Напомним: бактериофаги (фаги) или вирусы бактерий подразделяются на вирулентные и умеренные. Первые в результате своего жизненного цикла производят новые копии внутри бактериальной клетки и чаще всего вызывают разрушение её стенки, то есть реализуют литический цикл, в связи с чем их также называют *литическими*. Вторые «живут» в бактерии в виде генетической информации, чаще всего встраиваясь в её геном (такое состояние принято называть *профагом*), то есть реализуют лизогенный цикл, однако при наступлении «тяжёлых времён» они могут перейти к реализации литического цикла.

intestinal phage 1; Wip1), выделенный, как нетрудно догадаться, из кишечного тракта навозного червя (*Eisenia fetida*), проявляет высокую специфичность к *B. anthracis*. Фаг жирафа (Giraffe phage), выделенный из фекалий жирафа в зоопарке Лонг-Айленда (штат Нью-Йорк, США), способен лизировать штамм *B. anthracis* HS2-7, устойчивый к действию ципрофлоксацина. Выделенный из трупов в национальном парке Этоша (Намибия) фаг vB_VanS-Tsamsa является самым крупным из инфицирующих штаммы рода *Bacillus*. Очищенный эндолизин, закодированный в геноме этого фага, обладает бóльшим спектром активности, чем сам фаг. Можно видеть, что бактериофаги обладают потенциалом против антибиотикорезистентных штаммов, а также могут использоваться в диагностических целях, о чём подробнее поговорим в соответствующей главе. Кроме того, могут применяться и фаговые эндолизины, которые всё чаще рассматриваются в качестве мощных бактерицидных агентов при интраназальном заражении спорами. Так, в частности, в опыте¹ на мышах было показано, что эндолизин LysB4, полученный из фага B4, способен обеспечить выживаемость при интраназальном инфицировании спорами штамма *B. anthracis* Sterne в концентрации, в 4 раза превышающей 50%-ную летальную дозу.

Патогенетическая терапия включает местную обработку поражённых участков кожи растворами антисептиков без наложения повязок. Хирургическое вмешательство не рекомендуется ввиду наличия риска генерализации инфекции, однако оно может оказаться необходимым при определённых обстоятельствах (случаи с девушкой-барабанщицей из Главы 11 и случай атипичной кожной формы из Главы 12). При развитии инфекционно-токсического шока следует вводить 90–240 мг преднизолона. По показаниям проводят дезинтоксикационную терапию. Осуществляют внутривенные инфузии полиионных растворов для восстановления водно-электролитного баланса.

¹ Park S., Jun S. Y., et al. *Characterisation of the antibacterial properties of the recombinant phage endolysins AP50-31 and LysB4 as potent bactericidal agents against Bacillus anthracis*. Sci Rep. 2018; 8(1):18; DOI: 10.1038/s41598-017-18535-z.

Выписывают пациентов с кожной формой заболевания после формирования рубца на месте отторгнувшегося струпа. При иных формах – после полного клинического выздоровления и двукратного отрицательного результата бактериологического исследования образцов крови, мочи, кала и мокроты, которые проводят с интервалом 5 дней. Медицинское наблюдение после выписки не требуется.

Естественной средой обитания сибиреязвенного микроба является почва, в которой в виде споры он проводит большую часть своей жизни, чем сильно отличается, например, от чумного микроба, которому для выживания нужны носители, переносчики, эпизоотии¹... В этом смысле *B. anthracis* индивидуалист. Его географическое распространение не зависит от ареала обитания носителей и потому не ограничено природными очагами. Следовательно, он встречается даже в таких удалённых уголках, как Новая Зеландия, где последняя вспышка произошла в 1954 году, а вспышка на Ямале (Россия) в 2016 году, о которой подробно говорилось в Главе 6, показала, что сибиреязвенный микроб может скрываться даже в зоне вечной мерзлоты. Однако справедливости ради напомним, что глобальное распространение всё же ограничено определёнными тер-

¹ Справедливости ради отметим, что, по мнению некоторых специалистов, только постоянная циркуляция возбудителя между теплокровными животными обеспечивает ему выживание, поскольку почва является лишь фактором передачи, к которому сибиреязвенный микроб подстроился эволюционно, поэтому его естественной средой обитания являются теплокровные животные, а не почва. Тем не менее даже такая экология значительно отличается от экологии чумного микроба. С другой стороны, существует мнение, что сибиреязвенный микроб имеет две фазы существования (биотическую и абиотическую), поэтому эпизоотический процесс протекает непрерывно – *B. anthracis* просто циркулирует между двумя экологическими нишами.

риториями, например, в Австралии так называемым «поясом сибирской язвы» (anthrax belt), простирающимся от центральной части Нового Южного Уэльса до Виктории и южного Квинсленда. Почему так? Причин много, но одной из них являются почвы с высоким содержанием кальция и рН выше 6,1, поскольку сибиреязвенный микроб любит почвы «пощелочней». В этой связи территории, где обитает возбудитель, принято подразделять на три типа. Напомним. К **I типу** отнесены территории, расположенные на почвах, в которых отсутствуют условия для вегетации, т. е. в них возбудитель сохраняется исключительно в споровой форме. К **II типу** – территории, в которых возможно прорастание спор, но оно может прерываться из-за неблагоприятных факторов, таких как низкая температура и токсичность. К **III типу** – территории, в которых возможно прорастание и существование вегетативных форм с последующим размножением. В свою очередь эти территории делятся на те, где не происходит обогащения спорами из животных организмов (*подтип III-1*), то есть они не активны в эпизоотическом отношении (как правило, это старые скотомогильники), и те, где вегетативные формы способны попасть в живой организм и вызвать инфекционный процесс (*подтип III-2*)¹.

Как мы помним, эпизоотический процесс протекает быстро и сводится к инфицированию восприимчивого животного с последующим быстрым размножением бактерии, приводящем к его гибели, после чего возбудитель выходит во внешнюю среду, формирует споры и длительно сохраняется в почве. В целях предотвращения последнего место гибели животного орошают раствором хлорной извести^{2,3} (10 л на квадратный метр), после чего перека-

¹ Если Вы подзабыли экологию *B. anthracis*, перечитайте Главу 5.

² Смесь гипохлорита кальция $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, хлорида кальция CaCl_2 и гидроксида кальция $\text{Ca}(\text{OH})_2$. В быту называют просто «хлорка». Сухой препарат при обычных условиях медленно разлагается с выделением газа ClO_2 (потеря активного хлора около 5 % в год), однако в случае высокой влажности воздуха переходит в хлорноватистую кислоту HClO .

³ Советский врач, эпидемиолог и инфекционист Василий Игнатьевич Вашков (1902–1976) сообщает о методе В. В. Архипова, заключающемся в выращивании некоторых растений, «стерилизующих почву от сибиреязвенных микробов», в частности, клевера и ревеня (на втором году вегетации), вики, пшеницы, озимой ржи и чеснока (на первом году вегетации), лука (в период прорастания семян и образова-

пывають на глубину не менее 25 см, смешивая с сухой хлорной известью (1 часть на 3 части почвы), и увлажняют водой. Это место в границах возможной передачи возбудителя именуют *эпизоотическим очагом*. Очаг огораживают¹, на его территорию запрещается доступ посторонних лиц, а также ввоз и вывоз животных и получаемых от них продуктов питания. В молоко, полученное от больных животных, добавляют хлорную известь (25 % активного хлора), из расчёта 1 кг на 20 л молока, после чего выдерживают шесть часов и уничтожают. Молоко, полученное от контактных животных без клинических проявлений, кипятят 5 минут, после чего скармливают животным, находящимся в очаге, или уничтожают. За животными устанавливают ветеринарный надзор. Больных изолируют от контактных, которых, в случае отсутствия симптомов заболевания, вакцинируют (за исключением диких животных). Навоз, корм и подстилка подлежат сжиганию, а навозную жижу обеззараживают хлорной известью (1 кг на 20 л жижи). Больных животных в зависимости от правил, принятых в конкретном государстве, лечат или убивают.

Все работы на территории очага осуществляются в защитной одежде вакцинированными лицами, не имеющими повреждений кожных покровов. Защитная одежда, а также используемые транспортные средства подлежат обязательной дезинфекции на выезде из очага (круглосуточном контрольно-пропускном пункте). Для дезинфекции используются средства с высокой спороцидной активностью, например, пары формальдегида $\text{CH}_2\text{O}^{(2)}$. Спустя 20 дней после выздоровления последнего животного, утилизации трупов и продуктов жизнедеятельности карантин снимается. За это время все места, где содержались животные, также подвергаются дезинфекции, которую проводят в три этапа. Сначала проводят *предва-*

ния луковиц). Однако никаких доказательств действенности этого способа не обнаружено.

¹ Вдоль дорог устанавливают *дезинфекционные барьеры* протяжённостью не менее 6 м по ширине дороги. Такие же барьеры устанавливают на выезде из неблагоприятного пункта.

² Для газовой дезинфекции также возможно применение озона O_3 (5 мин.), паров надуксусной кислоты CH_3COOOH (10 мин.), оксида этилена $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$ и диоксида хлора ClO_2 (1 час), а также бромид метилена CH_2Br_2 (см. Озёров М. Ю., Каркищенко В. Н., и др. Средства для обеззараживания объектов, контаминированных спорами *B. anthracis*. Биомедицина. 2009; 1:28–37).

рительную дезинфекцию, которую осуществляют сразу после освобождения помещений. Затем – механическую очистку и текущую дезинфекцию, после которой не позднее чем за три дня до планируемой даты снятия карантина проводят заключительную дезинфекцию. В случае необходимости также проводят дезинсекцию и дератизацию. Определённую сложность может вызывать дезинфекция вертикальных поверхностей, обсеменённых сибиреязвенными спорами, поскольку имеет место быстрое стекание дезинфектанта. В этом случае рекомендуется¹ использование 3%-ного раствора хлорамина NH_2Cl , активированного 0,5%-ным раствором хлорида аммония $\text{NH}_3\cdot\text{HCl}$ в виде двух-четырёхкратной обработки (600–900 мл/м²).

В дальнейшем за очагом устанавливают статус *стационарно неблагополучного пункта*, за которым осуществляют эпидемиологический надзор. Если в последующее десятилетие появляется эпизоотическая и(или) эпидемическая активность, то пункт именуют *манифестным (активно неблагополучным)*, а если нет – *неманифестным (неактивным)*. Первые также подразделяются на *действующие*, на которых заболевание сибирской язвой регистрируется с интервалами до 5 лет, и *рецидивирующие*, на которых, соответственно, заболевание сибирской язвой регистрируется раз в 5 лет или реже.

Вокруг эпизоотического очага, примерно на 2–3 км от его границ (зависит от ландшафта и эпидемиологической ситуации), определяют территорию, именуемую *неблагополучным пунктом*. На данной территории также запрещается убой восприимчивых животных, их перемещение, ввоз и вывоз. Запрещается проведение сельскохозяйственных ярмарок, выставок и других мероприятий, связанных со скоплением восприимчивых животных, а также охота и отлов диких животных. Осуществляют вакцинацию сельскохозяйственных животных и дезинфекцию транспортных средств.

В радиусе 5–30 км от границ неблагополучного пункта определяют *угрожаемую зону*, на территорию которой запрещается ввоз невакцинированных животных, а также вывоз животных, кроме тех,

¹ Вашков В. И. Основные вопросы научно-исследовательской работы в области дезинфекции. Гигиена и санитария. 1953; 9:39–43.

что вывозятся на убой. Животные, находящиеся на данной территории, также подлежат вакцинации.

Трупы животных как потенциальные распространители возбудителя утилизируются путём сжигания. Однако это не всегда возможно, поэтому в ряде развивающихся стран практикуется изоляция от хищников, падальщиков и людей подручными материалами, такими как брезент, гофрированное железо или ветки деревьев. После завершения процессов гниения место выжигают или обрабатывают 10%-ным раствором формальдегида. В качестве альтернативы трупы можно засыпать хлорной известью, покрыть брезентом и оставить на 9 месяцев, по истечении которых собрать и захоронить кости.

Историческим способом утилизации трупов, который в некоторых местах практикуется до сего дня, является их захоронение с известью. Именно такие захоронения принято называть *сибиреязвенными скотомогильниками*. Причины, по которым применялась (и применяется) хлорная известь, затеряны в истории, но вполне возможно, что это был самый дешёвый и доступный дезинфектант. Тем не менее его эффективность – вопрос достаточно дискуссионный, поскольку, с одной стороны, 10%-ный раствор хлорной извести способен за 20 минут инактивировать 100 000 спор возбудителя, но, с другой стороны, 20 кг/м³ хлорной извести не способны инактивировать споры, находящиеся в канализационном иле^{<1>}. Именно поэтому лабораторное обследование скотомогильников на наличие *V. anthracis* является важной задачей *неспецифической* профилактики.

Конечно, на современном этапе сибиреязвенный скотомогильник – это огороженный двухметровым забором участок, расположенный на сухом возвышенном месте с низким количеством грунтовых вод, имеющий запирающиеся ворота и предупреждающую табличку. Доступ на его территорию посторонних лиц и животных ограничен. Во избежание подтопления по периметру организуется траншея шириной не менее 1,5 м и глубиной не менее 2 м (извле-

¹ Heninger S. J., Anderson C. A., et al. Decontamination of *Bacillus anthracis* spores: evaluation of various disinfectants. *Appl Biosaf.* 2009; 14(1):7–10; DOI: 10.1177/153567600901400103; *Inactivation of microorganisms in sewage sludge by stabilisation processes*, Ed.: A. H. Havelaar, P. L'Hermite, D. Strauch. London: Elsevier Applied Science Publications, 1985, 137 p.

чёрная земля размещается на территории скотомогильника), которая бетонируется на высоту 0,4 м выше уровня земли. Размещают скотомогильник на расстоянии **не менее километра** от жилых и животноводческих строений, дорог, рек и открытых водоёмов, определяя эту территорию как *санитарно-защитную зону*⁽¹⁾, на территории которой запрещено строительство жилых и социальных строений (домов, отелей, поликлиник, бань, прачечных, магазинов, автозаправочных станций и т. п.), проведение коммуникаций (включая трубопроводы), а также выпас скота.

Однако скотомогильники организовывались с незапамятных времён и нередко представляли собой просто стихийные захоронения на том самом месте, где происходил падеж скота (куда иногда подзахоранивают и сейчас). Говорить о каком-то удалении от населённых пунктов и рек в таких условиях не приходится. Тем более что реки со временем меняют своё русло, и часть скотомогильников буквально ушла на дно. Кроме того, поскольку учёт и картирование стали осуществлять сравнительно недавно, расположение не всех скотомогильников доподлинно известно. Именно поэтому изыскание неучтённых сибирезвенных захоронений является первостепенной задачей для обеспечения санитарного благополучия.

Обследование известных захоронений сводится к трём этапам.

Во-первых, собирают и оценивают сведения о состоянии скотомогильника, а также об эпизоотико-эпидемических проявлениях сибирской язвы на административной территории, где он расположен. На этом этапе также важно учитывать климат, ландшафт местности, наличие грунтовых вод, толщину промерзания почвы, численность выпасаемого поголовья скота и его вакцинный статус, а также наличие и расположение парков и природоохранных зон.

¹ По мнению ряда специалистов, радиус санитарно-защитной зоны может быть сокращён до 50 м для скотомогильников с низкой степенью эпизоотолого-эпидемиологической опасности, которая определяется **по формуле**:

$$D = S + P + 3NF + SF + 2 BF,$$

где *S* – ситуация на прилегающих к скотомогильнику территориях, *P* – потенциальная опасность скотомогильника, *NF* – природные факторы риска, *SF* – социальные факторы риска и *BF* – биологические факторы риска. Низкая степень: < 200 баллов. Высокая степень: > 350 баллов (см. Картавая С. А., Симонова Е. Г., и др. *Научное обоснование размеров санитарно-защитных зон сибирезвенных захоронений на основе комплексной оценки риска*. Гигиена и санитария. 2016; 95(7):601–606; DOI: 10.18821/0016–9900–2016–95–7–601–606).

Всё это позволяет оценить потенциальную опасность распространения инфекции.

Во-вторых, проводят полевые работы на территории скотомогильника, направленные на отбор проб и их последующее лабораторное исследование. Если точное место расположения скотомогильника не установлено, то определить его можно по наличию сравнительно более молодых деревьев по сравнению с окружающими по периметру участка, а также наличию впадин правильной формы, образованных в результате проседания почвы при разложении трупа. Как правило, отбирают почву с территории скотомогильника, а также кости и иные животные останки в случае их обнаружения. Работы осуществляют в противочумном костюме II типа, состоящем из косынки (шлема), перчаток (удлинённых), респиратора и противочумного халата (комбинезона). Обратите внимание, что для отбора проб важно защищать органы дыхания, поскольку имеется высокий риск ингалирования спор возбудителя. Территорию скотомогильника, как правило, условно разделяют на квадратные участки со сторонами не более 4 м. В каждом квадрате намечают по 5 точек по диагонали на равном расстоянии друг от друга или по 4 точки в углах квадрата и одной посередине (*метод конверта*). Далее снимают поверхностный слой (2–3 см) и буром, на глубину до 2 м, отбирают не менее 200 г почвы, из которых 100–200 г помещают в мешки из плотной ткани или стерильные стеклянные флаконы, ею закрытые. Не следует для данных целей использовать полиэтиленовые пакеты или плотно закрывающиеся тары, поскольку в таких условиях происходит бурное развитие актиномицетов, губительно действующих на сибиреязвенный микроб. Изъятую, но не отобранную для исследования почву смешивают с сухой хлорной известью (1 часть на 3 части почвы), увлажняют и помещают в углубления (шурф), образовавшиеся в результате отбора проб. Само место отбора дополнительно обрабатывают раствором хлорной извести (10 л на квадратный метр), а используемые инструменты фламбируют (т. е. обрабатывают пламенем).

Наконец, **в-третьих**, на основании данных, полученных с первых двух этапов, осуществляется анализ текущей ситуации и делается прогноз на будущее. Для этих целей полезно располагать архивными данными, а также знать генетические особенности возбу-
ди-

теля, если он был выделен. Нельзя пренебрежительно относиться к выделению атипичных штаммов сибиреязвенного микроба¹, особенно бесплазмидных, ведь плазмиды могут быть приобретены, а также штаммов иных представителей *B. cereus* complex, в частности *B. cereus* ss, *B. tropicus* и даже *B. thuringiensis*², поскольку, как мы помним, последнее время всё чаще выделяются атипичные штаммы, способные вызвать сибиреязвенноподобные заболевания, заканчивающиеся летальными исходами. Нельзя при отсутствии выделения возбудителя спешить с отменой вакцинации, поскольку, как наглядно показывает вспышка на Ямале (Глава 6), последствия могут быть печальными.

Помимо собственно мест захоронения животных, эпидемиологическую опасность также представляют, в меньшей степени, работа с почвой на эндемичной территории и, в большей степени, продукты животноводства, а именно мясо и шкуры. Из рассмотренных ранее клинических случаев мы знаем, что мясо больного животного может быть использовано в пищу (особенно на частных фермах, лишённых должного санитарно-ветеринарного надзора), а его шкура может таить в себе опасность многие годы (случай из Главы 11). В этой связи профилактические мероприятия должны быть направлены не столько на предотвращение возможности использования туши больного животного, сколько на выработку понимания того, почему использовать тушу нельзя. То есть необходимо в первую очередь заниматься санитарным просвещением населения.

Если сибирская язва выявлена у человека, то его немедленно госпитализируют, а место объявляют *эпидемическим очагом*, границы которого определяются территорией, на которой находятся

¹ Такие штаммы отличаются от *B. anthracis* морфологически, например, формируя нетипичные колонии или обладая подвижностью. Они также могут не иметь плазмид. Некоторые специалисты именуют их к **антракоидами**, отсылая к историческим видам *B. anthracoides* (Hüppe and Wood, 1889) и *B. pseudo-anthraxis* (Burri, 1894), которые выделялись бактериологами в конце XIX века. В современной классификации они отсутствуют, но тем не менее «штаммы *B. anthracoides*» всё ещё встречаются в научной литературе.

² Немного забегая вперёд, скажем, что, **не являясь** возбудителем заболеваний человека и теплокровных животных, они **способны** вызывать инфекции при определённых обстоятельствах. Поэтому если Вы немного устали от сибирской язвы, не расстраивайтесь: дальше будет интереснее!

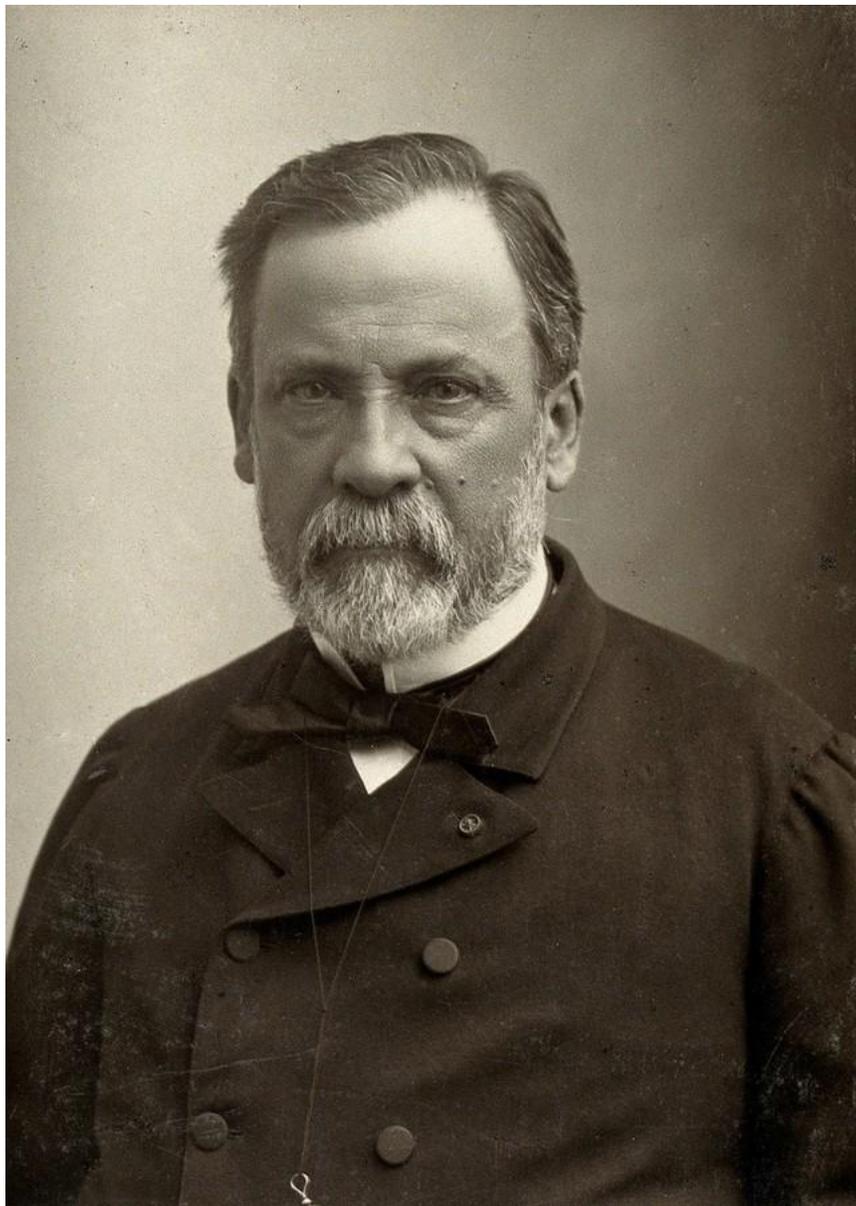
люди, имеющие риск заражения с учётом особенностей социально-бытовой обстановки и среды, в которой пребывает источник инфекции. Далее выявляют лиц, потенциально подвергшихся риску заражения, которым проводится профилактическое лечение (Табл. 18.1) и за которыми устанавливается медицинское наблюдение в течение 8 дней с ежедневным осмотром кожных покровов и двукратным измерением температуры тела. Также в очаге отбираются пробы и проводится дезинфекция, а в случае необходимости – дезинсекция и дератизация. Если эпидемиологический очаг расположен на территории предприятия (завода, фермы), то его деятельность приостанавливается, вводится запрет на использование сырья и продуктов животного происхождения. Шкуры и изделия из кожи целесообразно уничтожить, но если это невозможно, их подвергают *пикелеванию* – обработке 2%-ным раствором соляной кислоты и 15%-ным раствором поваренной соли при 30 °С в течение 40 минут, для чего раствор берут из расчёта 10 л раствора на 1 кг шкур. **Важно**, что поскольку в результате обработки концентрация соляной кислоты снижается, перед началом обработки в раствор добавляют соляной кислоты из расчёта 5 % от массы обрабатываемых шкур.

Теперь поговорим о *специфической* профилактике, а именно о вакцинах.

5 мая 1881 года. Пуи де Фор, Франция. Эмиль Ру¹ в присутствии Луи Пастёра и Шарля Шамберлена² прививает по пять капель ослабленной культуры возбудителя сибирской язвы (5 лет назад открытого Робертом Кохом) двадцати четырёх овцам, одной козе и шести коровам. Спустя 12 дней процедуру повторили с использованием ослабленной, но несколько более вирулентной культуры. Спустя ещё 14 дней, 31 мая, животных подвергли заражению вирулентной культурой, полученной «из телец паразита сибирской язвы, хранящихся в лаборатории с 21 марта 1877 года». Этой же культурой

¹ Pierre Paul Émile Roux, 1853–1933; французский врач, бактериолог. Член Французской академии наук (1899).

² Charles Edouard Chamberland, 1851–1908; французский химик и бактериолог. Соавтор первой вакцины против куриной холеры. Автор «свечей Шамберлена», бактериального фарфорового фильтра, через который можно было отделить бактерии от вирусов («фильтрующихся бактерий»).



*Луи Пастер
(фотография Феликса Надара)*

заразили ещё двадцать четыре овцы, одну козу и четыре коровы, причём заражение вакцинированных и невакцинированных животных проводили для чистоты эксперимента поочерёдно.

Спустя 48 часов присутствующие учёные и зрители увидели, что вакцинированные животные живы, а из невакцинированных двадцать одна овца и одна коза уже погибли. Ещё две овцы умерли на глазах зрителей, а одна скончалась к концу дня. Коровы не погибли, но имели значительные отёки в местах заражения. У вакцинированных животных никаких симптомов болезни не наблюдалось, однако 3 июня, в пятницу, одна вакцинированная овца всё же пала. На вскрытии в утробе был обнаружен плод, бывший уже двенадцать-пятнадцать дней мёртвым, что и стало причиной смерти. В том же году в своём отчёте^{<1>} Луи Пастер напишет: «Подводя итог, можно сказать, что теперь у нас есть вакцины против сибирской язвы, способные защитить от этой смертельной болезни, но сами по себе не являющиеся смертельными. Живые вакцины, которые можно выращивать по желанию и перевозить куда угодно без каких-либо изменений... Не скрою, что испытываю огромное удовольствие, ведь большинство ветеринаров с недоверием встретили эти результаты, однако сейчас они – самые ревностные апостолы нового учения...»

За всем этим грандиозным успехом скрывался небольшой обман. Заявлялось, что ослабление культуры достигалось действием температуры и кислорода. Так и было. Но несколько позже. Именно в этом опыте культуру ослабляли температурой и дихроматом калия, модифицировав метод Жана Туссёна². Дело в том, что Туссен ослаблял возбудитель карболовой кислотой (фенолом), но его опыты были труднопроизводимы, поэтому Пастер (и коллеги) заменили одно вещество, проявляющее антисептические свойства, другим. Конечно, можно сказать, что это совпадение, однако Туссен докладывал^{<3>} результаты своих опытов перед Французской акаде-

¹ Pasteur L., Chamberland C., Roux E. *Compte rendu sommaire des expériences faites à Pouilly-le-Fort, près Melun, sur la vaccination charbonneuse*. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences; 1881; XCII:1378–1383.

² Jean Joseph Henri Toussaint, 1847–1890; французский ветеринарный врач, бактериолог.

³ Journal officiel de la République française, 18 juil. 1880, 8341–8343 p.

мией наук 12 июля 1880 года. В тот же день с докладом по экологии возбудителя выступал и Пастер.

В защиту Пастера скажем, что вакцина Туссена не имела достаточной эффективности. Поэтому, как верно отметили в газете *Le Français*: «Вопрос не в том, кто первым придумал защищать животных от сибирской язвы профилактической прививкой. Если свести всё к этим терминам, то, несомненно, господина Пастера опередили, а господин Туссен, по-видимому, один из первых, кто установил возможность вакцинации против сибирской язвы. Но это ещё не всё: именно методичное культивирование этого грозного вируса¹ с целью доведения его до такой степени ослабления, строго говоря, и составляет важность и оригинальность исследований господина Пастера»².

Вакцина, получившая название *Vaccin Charbonneux Pasteur*, стала производиться во Франции и за её пределами. Однако, как мы помним, в опыте 1881 года для вакцинации использовалось два штамма – наиболее ослабленный (*Pasteur II*) и наименее ослабленный (*Pasteur I*), причём степень их вирулентности не устанавливалась³. Следовательно, вакцин было две, а учитывая разную степень восприимчивости животных к сибирской язве, на деле их производилось гораздо больше, поскольку не оставлялись попытки создать одну универсальную вакцину. В итоге уже к середине следующего столетия имелось большое количество штаммов под общим названием «штамм *Pasteur*», которые к тому же ещё и передавались в институты по всему миру. Тем не менее свою задачу вакцина выполнила – смертность животных от сибирской язвы была снижена до менее 1 %, несмотря на необходимость ежегодной ревакцинации и случаи заражения. Последнее можно объяснить тем, что некоторые вакцинные штаммы содержат плазмиды (напомним, что собственные плазмиды сибиреязвенного микроба были открыты лишь во второй половине XX века) несмотря на то, что плазида рХО1 должна теряться под действием температуры (на самом деле высо-

¹ От лат. «яд». Данный термин применялся к возбудителям бактериальных инфекций вплоть до второй половины XX века.

² *Le Français*, 7 juil. 1881.

³ Обычно бульонную культуру выдерживали при температуре 42–43 °С в течение 10–12 суток для получения наименее ослабленной вакцины и в течение 15–20 суток – для получения наиболее ослабленной вакцины.

котемпературная обработка лишь снижает число плазмидных копий). Так, исследование^{<1>} штамма Pasteur II показало присутствие в нём плазмид рХО1 и рХО2, способных синтезировать токсины и капсулу⁽²⁾.

Андре́ Штау́б³, исследовавший в стенах Института штаммы Pasteur в марте 1922 года, обнаружил, что все они синтезируют капсулу, но в разной степени. 29 декабря 1947 года он получил штамм, выделенный^{<4>} Ма́ксом Ште́рном⁵ в Южной Африке в 1935 году, обозначив его как «Вакцина VCSA для овец»⁶. Исследовав эффективность штамма и



Макс Штерн (по Bigalke R. D., 2000)

¹ Liang X., Zhang H., et al. *Identification of the pXO1 plasmid in attenuated Bacillus anthracis vaccine strains*. Virulence. 2016; 7(5):578–586; DOI: 10.1080/21505594.2016.1164366.

² Тот же «дефект» имелся и у штамма 71/12, полученного в 1883 году польским ботаником Львом Семёновичем Ценковским (1822–1887). Вакцина на основе этого штамма широко применялась для иммунизации животных на территории Российской Империи.

³ André Staub, ? – ?; французский врач, бактериолог.

⁴ Sterne M. *The use of anthrax vaccines prepared from avirulent (uncapsulated) variants of Bacillus anthracis*. Onderstepoort J Vet Sci Anim Ind. 1939; 13:307–312.

⁵ Max Sterne, 1905–1997; австрийский и южноафриканский ветеринарный врач, бактериолог.

⁶ В лабораторном журнале на стр. 139 имеется запись: «Вакцина VCSA для овец – различные испытания и случаи вакцинации показывают, что вакцина GA, приготовленная из спор первой вакцины, иногда неэффективна, а иногда слишком вирулентна. 29 декабря 1947 г. я получил штамм вакцины, использованный Штерном в Южной Африке. Я обозначаю этот штамм как VCSA. Он высокоспорогенен, культура в бульонной среде слегка эдематогенна для морской свинки (1/4 см3). Споры, обработанные в GA (Al.2 % – гелоза 2 %), безвредны для морской свинки (1/8 см3), нерегулярно вызывают отёк у кролика и обеспечивают лишь ограниченную защиту для этого животного. Однако эта вакцина регулярно поставляется овцам, козам и лошадям с 3 апреля 1948 года» (G – гелоза, A – алушь).

установив его неспособность к капсулообразованию (штамм потерял плазмиду рХО2), он тем не менее не стал его рассматривать в качестве альтернативы штаммам Pasteur. Сложно сказать, какой именно штамм Штерн отправил Штаубу (вспомните, что штаммы Sterne образуют целую группу в эволюционной линии А), но в итоге именно штамм Sterne 34F2, полученный при выращивании на 50%-ном сывороточном агаре в атмосфере CO₂ (10–30 %), стал основой для живых вакцин, применяемых в ветеринарии во многих странах мира, постепенно вытеснив штаммы Pasteur. В то время ещё не знали о влиянии капсулы на вирулентность, но эмпирические данные показывали явное преимущество неинкапсулированных (бескапсульных) штаммов перед инкапсулированными. Примечательно, что в своих лабораторных записях Штауб отмечает нестабильную эффективность вакцины. Как и в случае вакцины Pasteur, она могла не вызвать иммунного ответа или привести к летальному исходу. Последнее наталкивает нас на мысль о том, что распространение штаммов группы A.Br.Sterne (A.Br.075) эволюционной линии А является не столько следствием их естественного выноса из Африки, сколько «искусственного» распространения в составе одноимённой вакцины. И действительно, недавнее исследование¹ этой группы (также говорят «клады») показало, что штаммы внутри неё группируются в три подгруппы (подклады) – A.Br.076 (A.Br.Ortho-Sterne), A.Br.078 (A.Br.Para-Sterne) и A.Br.079 (A.Br.Eu-Sterne), из которых последняя полностью сформирована производными вакцинного штамма Sterne.

В настоящее время эта живая вакцина используется для иммунизации визуально здоровых **животных** (крупного рогатого скота, овец, коз, свиней и лошадей), выпасаемых на эндемичных территориях, и представляет собой суспензию спор *B. anthracis* Sterne 34F2 в сапонине. Хранят и транспортируют её при температуре от 2 до 8 °С, и после интенсивного встряхивания вводят по 1 мл (10⁶ спор) подкожно:

— крупному рогатому скоту и свиньям – в область шеи,

¹ Antwerpen M., Braun P., et al. *Archival and newly isolated historical Bacillus anthracis strains populate the deeper phylogeny of the A.Br.075(Sterne) clade*. Pathogens. 2025; 14(1):83; DOI: 10.3390/pathogens14010083.

- овцам¹ и козам – в бок (посередине между передними и задними ногами),
- лошадям – в среднюю часть шеи или в грудину.

В месте инъекции возможно появление припухлости. Вакцинацию осуществляют ежегодно, не менее чем за 42 дня до убоя. В случае необходимости (сложной эпидемиологической обстановки) спустя 2–3 недели проводят ревакцинацию. Как и в случае всех живых вакцин, хранение вскрытой ампулы запрещено, а остатки подлежат дезинфекции.

Существуют также комбинированные вакцины, например, вакцина Blanthrax®, содержащая споры *B. anthracis* Sterne 34F2 и *Clostridium chauvoei*. Ею иммунизируют крупный рогатый скот, овец и коз в возрасте от 6 месяцев. Вводят подкожно по 2 мл.

За пару лет до Штерна в Румынии² после выращивания на свёрнутой дефибрированной лошадиной крови был получен бескапсульный штамм 1190-R, названный так за способность формировать круглые плоские колонии R-формы на мясопептонном агаре. Споры этого штамма в сапонине стали основой вакцины Carboromvac®. Вакцинацию осуществляют подкожно: крупному рогатому скоту старше 2 месяцев вводят по 0,5 мл (15 x 10⁶ спор), овцам и свиньям старше 2 месяцев, а также лошадям старше 6 месяцев – по 0,2 мл (6 x 10⁶ спор), козам старше 2 месяцев – по 0,1 мл (3 x 10⁶ спор).

29 мая 1940 года в СССР Николаём Николаевичем Гинсбургом³ в стенах Санитарно-технического института Рабоче-крестьянской Красной Армии⁴ был получен бескапсульный мутант высоковирулентного штамма «Красная Нива», названный в честь института

¹ Поскольку овцы обладают высокой иммуногенностью и высокой восприимчивостью к возбудителю, в ряде стран предлагается вводить им половинную дозу.

² Stamatin N. Stamatin I. *Le pouvoir immunisant de souches acapsulogènes du B. anthracis*. C R Soc Biol. 1936; 122:491–493.

³ 1901–1969; советский военный врач, бактериолог. Лауреат Сталинской премии второй степени (1943). Автор работ по механизмам заражения животных сибирской язвой. Участник советской программы по разработке биологического оружия.

⁴ Ныне 48 Центральный НИИ Министерства обороны Российской Федерации.



Николай Николаевич Гинсбург
(ИС «Память народа» Министерства обороны Российской Федерации)



Александр Лазаревич Тамарин

СТИ-1. В том же году Александр Лазаревич Тамарин¹ получил бескапсульный штамм СТИ-3, который вместе со штаммом СТИ-1 стал основой вакцины СТИ². По всей видимости, это первая вакцина, использованная для иммунизации человека. Первоначально, правда, речь шла исключительно о военных, но в настоящее время вакцинации от сибирской язвы подлежат лица, чья деятельность связана с риском контакта с возбудителем (сотрудники лабораторий, животноводческих, мясозаготовительных, кожевенных предприятий, сельскохозяйственных ферм на эндемичных территориях), а также потенциально подвергшиеся заражению (экстренная профилактика).

Для этих целей используется вакцина на основе штамма СТИ-1, которая является одной из четырёх, рекомендованных Всемирной организацией здравоохранения. Вакцина представляет собой лиофилизат спор ($4-5 \times 10^9/\text{мл}$), который хранят и транспортируют при

¹ 1908–1989; советский военный врач, бактериолог. Лауреат Сталинской премии второй степени (1943). Автор работ по механизмам заражения животных сибирской язвой. Участник советской программы по разработке биологического оружия.

² Гинсбург Н. Н. *Сибирезвезенная вакцина СПИ*, в *Сборник работ НИИЭГ Красной Армии. Выпуск I. М., 1946, стр.5–90*; Тамарин А. Л., Спичын Н. А. *Разработка противосибирезвезенной вакцины СПИ-1*, в *Сборник работ НИИЭГ Красной Армии. Выпуск I. М., 1946, стр.153–170*.

температуре от 2 до 8 °С, однако допускается транспортирование в течение 20 суток при температуре не выше 25 °С. Первичную иммунизацию взрослых (за исключением беременных и кормящих) и детей старше 14 лет проводят двукратно скарификационным («накожным») способом с интервалом 20–30 суток, после чего ежегодная ревакцинация осуществляется подкожным способом. Вакцинацию по эпидемиологическим показаниям проводят исключительно подкожным способом⁽¹⁾. Существует также комбинированная вакцина, содержащая лиофилизат спор штамма СТИ-1 и протективного антигена, который обладает большей иммунологической эффективностью и которую вводят подкожно.

Скарификационный способ. Лиофилизат ресуспендируют 30%-ным водным раствором глицерина из расчёта 1 мл растворителя на 20 накожных доз, после чего встряхивают до образования гомогенной суспензии серовато-белого или желтовато-белого цвета с коричневым оттенком. **Важно**, что время разведения не должно превышать 5 минут, а разведённая вакцина должна быть использована в течение 4 часов! Вакцинацию осуществляют на наружную поверхность средней трети плеча, для чего место вакцинации обрабатывают 70%-ным раствором этилового спирта и дожидаются его испарения (использование иного дезинфектанта категорически запрещено). Далее место вакцинации располагают горизонтально и на кожу наносят по 2 капли вакцины (0,025 мл) на расстоянии 2–3 см друг от друга, для чего используют тонкую иголку шприца (не касаясь ею кожи). Кожу слегка натягивают и скарификатором (оспопрививателем) через каждую каплю делают две параллельные насечки длиной 10 см, следя, чтобы они не кровоточили (допустимо появление крови в виде мелких росинок). Капли вакцины втирают в насечки плоской стороной скарификатора в течение 30 секунд и дают подсохнуть в течение 5–10 минут. Очевидными недостатками этого способа являются сложности с дозированием (понятие «капля» весьма условно) и техникой выполнения при её кажущейся простоте.

Подкожный способ. Лиофилизат ресуспендируют в 1 мл стерильного физиологического раствора, встряхивают до образования

¹ Имеются сведения об эффективности аэрозольного метода, при котором споры распыляются в количестве $1,6 \times 10^{10}$ спор/см² в течение 15 минут.

гомогенной суспензии серовато-белого или желтовато-белого цвета с коричневым оттенком и переносят в стерильный флакон с физиологическим раствором из расчёта $(0,5x - 1)$ мл, где x – количество доз в препарате (т. е. если используется ампула на 100 доз, то ресуспендированный лиофилизат переносят в 49 мл физиологического раствора). Область нижнего угла лопатки обрабатывают 70%-ным раствором этилового спирта или 5%-ным спиртовым раствором йода (10%-ным раствором йод-повидона). Вакцину вводят в объёме 0,5 мл⁽¹⁾.

Вместе с тем подкожным способом допускается ежегодная вакцинация и здоровых взрослых животных (за исключением беременных на последнем месяце, а также в течение 7–10 суток после родов и хирургических вмешательств). Вновь вакцинированные животные подлежат изоляции от общего стада в течение двух недель. Овцам и козам вакцинацию осуществляют в область задней трети шеи или внутренней поверхности бедра. Крупному рогатому скоту, оленям, верблюдам, лошадям и ослам – в область задней трети шеи. Свиньям – в область внутренней поверхности бедра или за ухом, а пушным зверям – в область внутренней поверхности бедра или подхвостовое зеркало (т. е. похвостовую часть внутренней стороны бедра).

Молодняк с трёхмесячного возраста (жеребята с девятимесячного) вакцинируется двукратно с интервалом в 6 месяцев. Овцам, козам и пушным зверям в возрасте старше 3 месяцев, а также свиньям в возрасте от 3 до 6 месяцев вводят по 0,5 мл (10^9 спор), а свиньям старше 6 месяцев и крупному рогатому скоту, оленям, верблюдам, лошадям и ослам в возрасте старше 3 месяцев – по 1 мл (2×10^9 спор).

¹ В качестве варианта подкожного способа введения рассматривают **безыгольный** (струйный), когда с помощью инъектора препарат вводится тонкой стружкой под давлением со скоростью около 222 м/с. Существуют споры относительно безопасности данного метода, тем не менее он весьма удобен для быстрой вакцинации больших контингентов, а вероятность обратного тока агентов «шприцевых» инфекций (против давления) видится маловероятной. Для обеззараживания части инъектора, соприкасающиеся с вакциной, погружают в 6%-ный раствор перекиси водорода с 0,5%-ным ПАВ (т. е. поверхностно-активного вещества) на один час при температуре не ниже 50°C.

В 1986 году в стенах Всесоюзного НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии была разработана вакцина на основе штамма 55-ВНИИВВиМ, которая также применяется для вакцинации животных. Как и СТИ, она представляет собой лиофилизат спор, но может вводиться как подкожно (по схеме как для СТИ), так и внутривенно. В последнем случае вакцинацию осуществляют крупному рогатому скоту, оленям и верблюдам в беспшёрстный участок промежности, лошадям и ослам – в область задней трети шеи, овца и пушным зверям – в подхвостовое зеркало, а свиньям – за ухом. Вводят по 0,2 мл крупному рогатому скоту, оленям, верблюдам, лошадям, ослам и свиньям, а по 0,1 мл – овцам и пушным зверям. Убой на мясо допустим не ранее чем через 10 дней после вакцинации¹.

Ещё одной живой вакциной, рекомендуемой Всемирной организацией здравоохранения для вакцинации людей, является вакцина на основе штамма А16R, полученного в Китае действием ультрафиолетового излучения на штамм А16. Вакцина представляет собой суспензию спор (4×10^9 /мл) в 50%-ном водном растворе глицерина, которую хранят при температуре 2–10 °С. Иммунизацию взрослых проводят подкожным способом. **Важно**, что вскрытую ампулу с вакциной следует использовать в течение 3 часов. Как и в случае вакцины СТИ, на кожу наносят две капли вакцины на расстоянии 2–3 см друг от друга. Кожу слегка натягивают и скарификатором (оспопрививателем) на месте каждой капли делают четыре пересекающиеся насечки длиной 1–1,5 см в виде «#», следя, чтобы они не кровоточили (допустимо появление крови в виде мелких росинок). Через 5–10 минут место вакцинации протирают сухим ватным диском.

Вероятно, Вы уже задались вопросом, почему вакциной на основе штаммов СТИ и А16R иммунизируют как животных, так и чело-

¹ Вспомните случай из Главы 16 (Рис. 16.11), когда семья заразилась от мяса телёнка, иммунизированного этой вакциной. Очевидно, что не только нарушение транспортировки и правил вакцинации привели к инфицированию, но и невыдержанный карантин перед убоем, равно как и убой явно больного животного. Таким образом, этот случай наглядно показывает, как промахи в конкретных звеньях профилактических мероприятий могут в совокупности привести к заражению людей. И это снова пример действия модели швейцарского сыра, которую упоминали в Главе 15. Забыли? Перечитайте!

века, а вакциной на основе штамма Sterne – только животных? Дело в том, что в ряде государств введение в организм человека живых микроорганизмов запрещено. Особенно когда имеются альтернативы. Вспомните, пожалуйста, патогенез сибирской язвы и попытайтесь ответить: что ещё может вызывать иммунный ответ?

Вполне вероятно, что внимательные уже обнаружили подсказку, когда речь шла о комбинированной вакцине на основе штамма СТИ и протективного антигена. Конечно, последний, будучи чужеродным белком для иммунизируемого организма, будет вызывать иммунный ответ. Так, ещё в 1904 году, О. Бэйл обнаружил^{1>}, что отёчная жидкость, возникающая у некоторых животных, болеющих сибирской язвой, содержит некий «агрессин», способный иммунизировать животных, за что и называет его *протективным антигеном*. Однако природа антигена будет оставаться непонятной для исследователей до 1946 года, когда Г. Гладстон докажет^{2>} его роль в формировании иммунитета. И тут самые внимательные, вспомнив Главу 3, скажут, что Гарри Смит³ выделил токсины сибиреязвенного микроба. И действительно, к началу 1950-х годов он получит токсины и установит, что они состоят из соединения летального и отёчного факторов с протективным антигеном (РА + LF/EF), синтез которых, напомним, кодируется плазмидой рХО1. А у какого популярного вакцинного штамма она имеется? Правильно, штамма Sterne. Так, осадив квасцами синтезируемые этим штаммом протективный антиген, летальный и отёчный факторы получили первую неживую сибиреязвенную вакцину – *преципитированную вакцину AVP* (от англ. Anthrax vaccine precipitated). Дело было в Великобритании, поэтому чуть позже в США получают собственную вакцину из неинкапсулированного штамма V 770-NP1-R⁽⁴⁾,

¹ Bail O. *Untersuchungen über natürliche und künstliche Milzbrandimmunität*. Zentrabl Bakt Parasiten Infektionskr I rig. 1904; 36:262–272.

² Gladston G. P. *Immunity to anthrax: protective antigen present in cell-free culture filtrates*. Br J Exp Pathol. 1946; 27(6):394–418.

³ Harry Smith, 1921–2011; британский биохимик, бактериолог. Член Королевского общества (1979). Автор работ по механизмам заражения животных сибирской язвой. Участник британской программы по разработке биологического оружия (Портон-Даун).

⁴ Строго говоря, первоначально была получена вакцина на основе другого штамма, однако его токсины содержали преимущественно протективный антиген, поэтому поиск подходящего штамма-продуцента был продолжен. В итоге мутант

«токсины» которого адсорбируют на амфогеле (адьюванте гидроксида алюминия), ввиду чего препарат называют *адсорбированной вакциной AVA* (от англ. Anthrax Vaccine Adsorbed; BioThrax®). Как и в случае СССР, первоначально вакцины использовались только для военных нужд, однако уже к 1970 году их постепенно начинают использовать для гражданского применения, и в настоящее время они также рекомендованы Всемирной организацией здравоохранения для иммунизации людей.

Преципитированную вакцину вводят взрослым внутримышечно или подкожно по 0,5 мл. В первом случае ревакцинацию осуществляют на 3-й, 6-й и 32-й неделе, а во втором – на 3-й, 6-й и 9-й неделе, после чего дальнейшую вакцинацию в обоих случаях проводят ежегодно.

Адсорбированную вакцину вводят взрослым по 0,5 мл внутримышечно, ревакцинацию проводят на 30-й день и 6-й месяц. Дальнейшая вакцинация осуществляется через ещё 6 и 12 месяцев (т. е. через год и полтора после первого введения), а затем ежегодно. В случае невозможности внутримышечного введения допустимо вводить подкожно по 0,5 мл, после чего ревакцинацию осуществляют на 14-й день, 30-й день и 6-й месяц. В целях профилактики вводят по 0,5 мл подкожно, после чего осуществляют ревакцинацию на 14-й и 30-й день (в сочетании с антибиотикотерапией).

Как можно видеть из периодов ревакцинации для всех вакцин, формируемый у людей и животных иммунитет не является стойким. Имеются побочные эффекты, включающие головные боли, повышение температуры тела и даже развитие инфекционного процесса, который может закончиться летальным исходом. Поэтому разработки вакцин продолжают. Живые вакцины предлагается дополнять иными вакцинами^{(1), <2>} для снижения стресса живот-

штамма Vollume (A.Br.Vollume), получивший название V770-NP1-R (A.Br.V770), обладал необходимыми свойствами.

¹ Особенно интересны опыты по клонированию гена *pag* сибиреязвенного микроба, синтезирующего протективный антиген, в клетки вакцинных штаммов *Y. pestis* и *F. tularensis*, позволяющие получить иммунную защиту сразу от двух особо опасных инфекций. Причём поскольку вакцинные штаммы туляремийного микроба индуцируют стойкий иммунный ответ за счёт персистенции внутри клеток организма-хозяина, можно прогнозировать длительный иммунный ответ и на сибирскую язву.

ного на фоне уколов, покрывать защитной капсулой для возможности перорального введения животным (капсула защищает споры от действия желудочного сока)^{<1>}. Предлагаются вакцины на основе инактивированных формалином спор и протективного антигена^{<2>}, вакцины на основе рекомбинантного протективного антигена, например, растительного происхождения^{<3>}, вакцины AVA, дополненные иммуностимулирующим олигодезоксинуклеотидом^{<4>}, связываемым с TLR-9 для стимулирования иммунного ответа, и даже вакцины на основе плазмидной ДНК *B. anthracis*, кодирующей протективный антиген и летальный фактор^{<5>}. Последняя оказалась особенно эффективна в опытах по интраназальному заражению кроликов.

Важной проблемой живых вакцин также остаётся неоднородность состава используемой культуры. Так, например, штамм СТИ-1 диссоциирует на два варианта: *первый вариант* формирует мелкие (до 2,5 мм), выпуклые, блестящие колонии с чётким краем и мелкими крутыми завитками на поверхности, тогда как *второй вариант*, напротив, формирует крупные (3–5 мм), плоские, матовые, шероховатые колонии с плоским краем и крупными сглаженными завитками. Исследования^{<6>} на морских свинках показывают, что первый вариант обладает значительно большей иммуногенностью, а гетерогенность штаммов объясняется делециями в генах *pag* и *lef* (напомним, ответственных за синтез протективного антигена и ле-

² RU 2056861 C1, 27.03.1996.

¹ Benn J. S., Chaki S. P., et al. *Protective antibody response following oral vaccination with microencapsulated Bacillus Anthracis Sterne strain 34F2 spores*. NPJ Vaccines. 2020; 5:59; DOI: 10.1038/s41541-020-0208-3.

² Brossier F., Levy M., et al. *Anthrax spores make an essential contribution to vaccine efficacy*. Infect Immun. 2002; 70(2):661–664; DOI: 10.1128/IAI.70.2.661–664.2002.

³ Paolino K. M., Regules J. A., et al. *Safety and immunogenicity of a plant-derived recombinant protective antigen (rPA)-based vaccine against Bacillus anthracis: A Phase 1 dose-escalation study in healthy adults*. Vaccine. 2022; 40(12):1864–1871; DOI: 10.1016/j.vaccine.2022.01.047.

⁴ Shearer J. D., Henning L., et al. *Efficacy of the AV7909 anthrax vaccine candidate in guinea pigs and nonhuman primates following two immunizations two weeks apart*. Vaccine. 2021; 39(1):1–5; DOI: 10.1016/j.vaccine.2020.10.095.

⁵ Hermanson G., Whitlow V., et al. *A cationic lipid-formulated plasmid DNA vaccine confers sustained antibody-mediated protection against aerosolized anthrax spores*. PNAS. 2004; 101(37):13601–13606; DOI: 10.1073/pnas.0405557101.

⁶ Цыганкова О. И., Фунтикова Т. Н. и др. *Изучение некоторых свойств субкультур сибирязевого вакцинного штамма СТИ-1 in vitro*, в сб.: Иммунология и специфическая профилактика особо опасных инфекций. Саратов, 1993, 192 с.

тального фактора), возникающими в результате длительного хранения и множественных пересевов. При этом очевидно, что от вариантного состава напрямую зависит эффективность вакцины, поэтому решением данной проблемы может стать такое изменение штамма, благодаря которому он станет стабильным, в частности, введение в него дополнительных генетических детерминант¹. Исследования ведутся, и кто знает, может быть, универсальную вакцину, которую так мечтал создать Луи Пастер, подарите миру именно Вы!

В предыдущей главе мы говорили о том, что материал, подозрительный на содержание (контаминацию) сибиреязвенным микробом, подлежит лабораторному исследованию, и, в частности, рассмотрели правила взятия проб почвы. Однако, как вы могли видеть, почва не единственный исследуемый материал. Так, у больных в зависимости от формы заболевания исследуют отделяемое везикулы или карбункула, язвы, фрагменты струпа, кровь, ликвор, мокроту, испражнения. **Важно** помнить, что забор материала от больных осуществляют до начала антибиотикотерапии! Правильность взятия материала непосредственно влияет на качество лабораторного исследования, позволяя избежать ложноотрицательных результатов. Именно поэтому медицинский персонал осуществляет процедуру отбора под контролем специалиста по особо опасным инфекциям. У животных исследуют кровь, а у трупа, как говорилось ранее, берут ухо или кровь, полученную от надреза уха.

¹ Маринин А. И., Шипикова Н. А. и др. *Вариант сибиреязвенного вакцинного штамма СПП-1 с гемолитической и лецитиназной активностями*. Бактериология. 2023; 8(1):23–29; DOI: 10.20953/2500–1027–2023–1–23–29.

Из объектов окружающей среды отбирают почву, воду, воздух, корма, а также делают смывы. Кратко рассмотрим способы взятия материала.

Содержимое везикулы или карбункула. Аккуратно обрабатывают этиловым спиртом кожу вокруг поражённого места и поверхность везикулы (карбункула). Затем отсасывают содержимое с помощью шприца или пастеровской пипетки и помещают в микроцентрифужные пробирки, содержащие 0,1–0,2 мл транспортной среды, а иголку шприца (кончик пипетки) помещают в пробирку с питательным бульоном. Отделяемое язвы и фрагменты струпа снимают с поверхности стерильным тампоном, смоченным физиологическим раствором (во втором случае допустимо использовать пинцет), и помещают в микроцентрифужные пробирки. В случае проведения ПЦР пробирки должны содержать по 0,1–0,2 мл транспортной среды.

Кровь (человек). Кожу над пунктируемой веней в районе локтевого сгиба тщательно протирают 70%-ным раствором этилового спирта, излишки которого стирают сухой стерильной салфеткой. Отбирают кровь шприцем в количестве 3–5 мл, из которых 0,1–0,2 мл сразу же, непосредственно у постели больного, засевают в питательную среду (агар и бульон Хоттінгера), а также делают два-три тонких мазка на предметных стёклах. Оставшуюся кровь, избегая образования пены, переносят в пробирку, содержащую 6%-ный раствор этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) в отношении 1:20 к объёму крови. *Желательно*, чтобы посев и мазок осуществлял сотрудник лаборатории (бактериолог, микробиолог), однако это может выполнять и специалист, отбирающий кровь, если он прошёл соответствующий инструктаж.

В случае необходимости, например, при менингите, возможен забор ликвора, который отбирают по 0,5 мл после пункции поясничной или субокципитальной («затылочной») области, а также из мозговых желудочков. Мокроту и испражнения отбирают в стерильную посуду, особенно если имеется присутствие слизи с кровью.

При подозрении на ингаляционное заражение целесообразно взять мазки из носовой полости. Для этого используют стерильный

зонд («тупфер»). Принято использовать сухой зонд, однако исследования¹ показывают, что предварительно увлажнённый физиологическим раствором зонд более эффективен для извлечения спор. Лёгким движением зонд вводят в носовой проход на несколько сантиметров. Можно предварительно запрокинуть голову пациента таким образом, чтобы зонд входил перпендикулярно относительно тела пациента. Мазок берут разными зондами из обеих ноздрей, после чего помещают рабочие части обоих зондов в пробирку с физиологическим раствором для концентрирования материала. Далее, ряд специалистов рекомендует вынуть их через 10–15 секунд, аккуратно отжимая по стенке во избежание разбрызгивания. Однако имеет смысл аккуратно откусить нерабочую часть зонда таким образом, чтобы имелась возможность закрыть пробирку. также возможно взятие мазка из ротоглотки. В случае проведения ПЦР целесообразно повторить процедуру, поместив рабочую часть зонда в пробирку с 1,5–1,7 мл транспортной среды. Целесообразно также взять мазок из ротоглотки, натошак или через 3–4 часа после еды, для чего голову пациента слегка запрокидывают и фиксируют (во избежание рефлекторных отдёргиваний). Язык прижимают стерильной деревянной палочкой (шпателем) и собирают материал с задней поверхности глотки (**не задевая** абсцессов, если таковые имеются!). Зонд помещают в пробирку с физиологическим раствором, как и в случае мазка из носоглотки (допустимо опустить зонд в ту же пробирку, куда поместили зонды из носоглотки).

Кровь (животное). С помощью шприца отбирают образец крови из яремной или ушной вен (последнее особенно эффективно у коров), а у свиней – из хвостовой.

От трупа животного берут ухо, для чего его (с той стороны, где лежит труп) туго перевязывают лигатурой у основания в двух местах и отрезают между ними. Место отреза прижигают, а с уха, не снимая лигатуры, делают несколько мазков (мазков-отпечатков), после чего аккуратно заворачивают в пергаментную бумагу, смоченную в растворе дезинфектанта. Мазки высушивают на воздухе и помещают в чашки Петри, которые обёртывают плотной бумагой, маркируя надпись «не фиксирован».

¹ Rose L., Jensen B., et al. *Swab materials and Bacillus anthracis spore recovery from nonporous surfaces*. Emerg Infect Dis. 2004; 10(6):1023–1029; DOI: 10.3201/eid1006.030716.

В том случае, если подозрение на сибирскую язву возникло уже **после** начала патологоанатомического исследования, все манипуляции с трупом прекращают, а на исследование отправляют кровь, кусочки органов (в первую очередь селезёнки, печени и лимфатических узлов), костный мозг (из грудины или бедренной кости). От трупов свиней дополнительно забирают заглоченные лимфатические узлы и участки отёчной соединительной ткани. В случае проведения ПЦР по 0,1–1 г материала дополнительно помещают в пробирки с физиологическим раствором или транспортной средой.

Для исследования заготовленной ранее шерсти производят отбор не менее 5 образцов массой около 2 г из различных мест, отдавая предпочтение наиболее загрязнённой шерсти. Если шерсть уже упакована, то отбирают не менее 10 образцов из различных мест каждой упаковки (кипы), а также скопившуюся пыль, если она имеется. От краёв заготовленной кожи отрезают кусочки размером 3 x 3 см (незагнившие и незаплесневевшие). У свежих шкур берут фрагменты с мест кровоподтёков и инфильтратов, если такие имеются.

Пробы незатаренных кормов (зерно, отруби, комбикорм) отбирают из расчёта не менее 5 проб от каждой партии, где на одну пробу приходится не менее 400 г на 4 м, причём отбор осуществляют равномерно по всей глубине. В случае затаренных кормов пробы берут от каждой упаковки партии сухим стерильным шупом, который после каждой партии очищают и фламбируют. От грубых кормов (сено, солома) и зелёной массы из различных мест плотно сложенной массы (скриды) при помощи ножниц и пинцета берут по 40 г на каждые 4 м площади. Корнеплоды отбирают из расчёта 1–3 штуки (в зависимости от размера) на каждые 4 м площади. Все отобранные пробы для каждой категории (в случае кормов – партии) тщательно перемешивают и формируют в среднюю пробу массой не менее 500 г, которую помещают в закрывающийся полиэтиленовый пакет или стерильную стеклянную банку.

Смывы с объектов окружающей среды делают с мест, наиболее подвергшихся возможной контаминацией возбудителем. Для этого стерильным зондом («тупфером»), предварительно смоченным дистиллированной водой или физиологическим раствором, круго-

выми движениями тщательно протирают поверхность площадью около 100 см², после чего аккуратно помещают в пробирку с дистиллированной водой или физиологическим раствором. Нерабочую поверхность зонда обрезается.

Забор проб почвы с мест вынужденного убоя скота, стоянок или водопоя животных, мест обнаружения трупов осуществляют на глубину до 15 см. В случае больших участков площадь условно делят на квадраты со сторонами не более 4 метров. В каждом квадрате намечают по 5 точек по диагонали на равном расстоянии друг от друга или по 4 точки в углах квадрата и одной посередине (*метод конверта*). Далее снимают поверхностный слой (2–3 см) и буром, на глубину до 15 см, отбирают не менее 200 г почвы, из которых 100–200 г помещают в мешки из плотной ткани или стерильные стеклянные флаконы, ею закрытые. Не следует для данных целей использовать полиэтиленовые пакеты или плотно закрывающиеся тары, поскольку в таких условиях происходит бурное развитие актиномицетов, губительно действующих на сибиреязвенный микроб. Изъятую, но не отобранную для исследования почву смешивают с сухой хлорной известью (1 часть на 3 части почвы), увлажняют и помещают в углубления (шурф), образовавшиеся в результате отбора проб. Само место отбора дополнительно обрабатывают раствором хлорной извести (10 л на квадратный метр), а используемые инструменты фламбируют.

Внимательные, конечно же, заметили, что отбор проб почвы осуществляется тем же способом, как и в случае скотомогильников. Ну а самые внимательные заметили, в чём отличие? Правильно, в случае скотомогильника отбирают почву на глубину до 2 м, тогда как в данном случае – только до 15 см.

Пробы воды берут у поверхности (на глубине около 10 см) и у дна при помощи батометра или иными средствами в объёме от 0,5 до 1 л, и помещают в стерильные стеклянные банки, закрывающиеся стерильными резиновыми пробками (использование закручивающихся крышек не рекомендуется ввиду возможности подтекания пробы по резьбе во время снятия). Также у береговой линии отбирают не менее 200 г придонного осадка, из которого 100–200 г помещают в мешки из плотной ткани или флаконы, ею закрытые.



Отбор проб почвы с места убоя больного телёнка из случая, описанного в Главе 16 (Рис. 16.11). Фотография любезно предоставлена Сапарбаем Тезекбаевичем Жолдошевым

Пробы воздуха в объёме не менее 3–5 м³ отбираются специальными приборами, «прогоняющими» его через фильтры или сорбирующую жидкость.

Все пробы упаковывают с соблюдением принципа **тройной упаковки**¹ и доставляют в лабораторию в течение суток при температуре 2–8 °С (образцы плазмы и сыворотки допустимо доставлять в течение 5 суток). Образцы биоматериалов, за исключением

¹ Согласно этому принципу материал помещается в первичную ёмкость, водонепроницаемую и герметичную (банку, пакет, пробирку). Одну или несколько первичных ёмкостей помещают во вторичную тару, также водонепроницаемую и герметичную, содержащую достаточное количество адсорбирующего материала на случай повреждения (протечки) первичной ёмкости. Сюда же кладут одно из направлений (второе везёт лицо, осуществляющее доставку). Наконец, одну (реже несколько) вторичную тару помещают в наружную тару, содержащую достаточное количество амортизирующего вещества, минимальные размеры которой не могут быть меньше, чем 10 x 10 см. На упакованный материал составляется Акт упаковки, в котором указывается, что конкретно упаковано и как упаковано, а также Акт передачи патогенных биологических агентов. Подробнее об этом читайте в Главе 29 Оперы о чуме.

крови, допускается транспортировать в течение недели при температуре минус 20 °С или дольше при температуре минус 70 °С. Допускается однократное замораживание – оттаивание.

Как видно из предыдущих глав, сибиреязвенный микроб является патогеном, способным вызвать серьёзное заболевание у человека и животных, и он может легко распространяться, в частности быть легко доставленным до восприимчивого организма, как это было во время Amerithrax (Глава 15), способен вызвать общественную панику и социальные потрясения, а также требует специальных действий по обеспечению готовности общественного здравоохранения. Вместе с тем имеются достаточно эффективные способы лечения вызываемого им заболевания. По этой причине *B. anthracis* отнесён к патогенным биологическим агентам (ПБА) 3 группы опасности (риска) согласно Всемирной организации здравоохранения¹, ко II группе патогенности (опасности) в России и к категории А в США, поэтому с отобранным для исследования материалом, как потенциально его содержащим, работают в изолированных (сдерживающих) лабораториях не ниже **третьего уровня** биологической безопасности или BSL-3 (от англ. biosafety level). Эти лаборатории являются герметичными инженерно-строительными конструкциями со сложной ограждающей (барьерной) системой, не допускающей «выход» ПБА. Они оснащены системой фильтрации воздуха и обеззараживания отходов, а работу в них выполняет квалифицированный персонал, обученный методам безопасной работы с ПБА, от профессионализма которого эпидемиологическое благополучие населения

¹ *Laboratory biosafety manual. 3rd ed.*. World Health Organization, WHO/CDS/CSR/LYO/2004.11, 2004, 181 p.

зависит не меньше, чем от качества конструктивного выполнения лаборатории¹.

Поступивший в лабораторию материал подлежит пробоподготовке для последующего бактериологического исследования. Кусочки органов и тканей, а также кусочки проб мяса измельчают ножницами или гомогенизатором, после чего заливают физиологическим раствором в соотношении 1 : 10. Полученную таким образом суспензию фильтруют или отбирают шприцем через марлевый тампон. Похожим образом подготавливают кусочки шкур, для чего их измельчают ножницами и помещают в ступку, после чего заливают физиологическим раствором в соотношении 1 : 10 и оставляют на 2–3 часа. По прошествии этого времени размякшие кусочки растирают пестиком до получения волокнистой мезги, которую отжимают о край ступки и удаляют. От проб шерсти отбирают наиболее загрязнённые фрагменты, которые измельчают ножницами, помещают в колбу (со всеми частицами грязи и пыли), заливают физиологическим раствором. Далее колбу закрывают и интенсивно встряхивают в течение 5–10 минут.

Пробы почвы освобождают от посторонних примесей (корней, камешков) и тщательно перемешивают, после чего отбирают около 100 г, которые помещают в колбу. Далее в колбу добавляют физиологический раствор или 0,5%-ный раствор пиррофосфата натрия таким образом, чтобы получить около 20 мл суспензии. Колбу закрывают и интенсивно встряхивают в течение 5–10 минут, после чего дают отстояться 3–5 минут и отбирают надосадочную жидкость. Повторяют процедуру с половинным объёмом, то есть в колбу снова добавляют физиологический раствор или 0,5%-ный раствор пиррофосфата натрия, получая уже 10 мл суспензии. После встряхивания и отстаивания надосадочную жидкость добавляют к надосадочной жидкости, полученной в первый раз, и центрифугируют 15 минут при 1000 об/мин. Полученный надосадок переносят в новый сосуд и центрифугируют 15 минут при 6000 об/мин для концентрирования микробной взвеси, которая, соответственно, уйдёт в осадок, поэтому его отбирают и ресуспендируют в 1 мл

¹ Подробнее о подразделении ПБА на группы патогенности (опасности), устройстве лаборатории и методах безопасной работы (включая действия при возникновении аварии) читайте в Главах 27 и 30 Оперы о чуме.

физиологического раствора. Аналогичным образом подготавливают различные порошкообразные вещества, включая корма и пищевые продукты.

Бактерии, содержащиеся в воде, концентрируют путём фильтрации через мембранные фильтры (3 мкм) с последующим скабливанием осадка с фильтра или его измельчения ножницами. Допустимо центрифугирование в течение 15 мин при 6000 об/мин. Полученный фильтрованием или центрифугированием осадок ресуспендируют в 1–2 мл физиологического раствора. Если в пробе воды содержались фрагменты ила, то её предварительно фильтруют через 3 слоя марли.

Подготовленные таким образом пробы, за исключением проб, потенциально содержащих возбудитель в вегетативной форме (кровь, кусочки органов, тканей и мяса), делят на **две** части, одну из которых для избавления от посторонней микрофлоры прогревают при 80 °С в течение 20 минут на водяной бане, не допуская высыхания пробы.

Для выделения культуры («золотой стандарт») подготовленный непрогретый материал засевают на жидкие (бульоны), полужидкие (полутвёрдые) и твёрдые питательные среды. В частности, на чашки с мясопептонным агаром, агаром Хоттинера (рН 7,2) и селективную дифференциально-диагностическую среду с 0,01%-ным раствором фенолфталеинфосфата натрия, а также пробирку с мясопептонным бульоном¹. Материал, потенциально загрязнённый посторонней микрофлорой (корма, пробы почвы, смывы и проч.), следует наносить на чашки по 1–2 капли (0,1 мл) и тщательно растирать шпателем, перенося на вторую и третью чашки (метод истощения). Если материал не загрязнён (кровь, пунктаты, кусочки органов), то посев проводят шпателем без истощения либо петлёй. При этом некоторые специалисты рекомендуют наносить материал на половину чашки «площадкой», после чего, оторвав петлю (не обжигая), провести зигзагообразно для получения единичных колоний. Все посевы помещаются в термостат (дном вверх!) при температуре 36 °С на 18–20 часов. Если спустя это время рост не обна-

¹ Рецептуры (прописи) питательных сред приведены в Приложении.

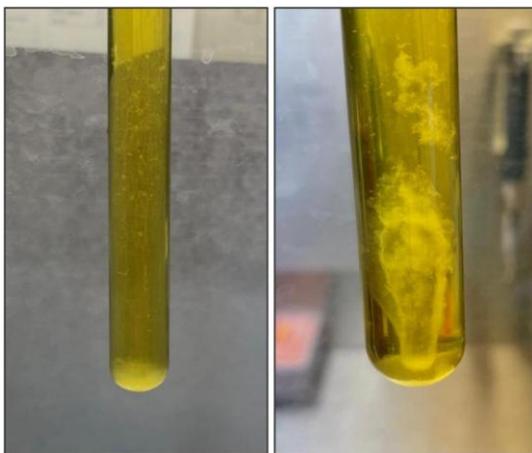


Рис. 21.1. Рост *B. anthracis* в бульоне в виде «комочка ваты» на дне (слева), который не растворится при взбалтывании (справа)

ружен, посеы остав-
ляют в термостате
ещё на 48 часов¹.

После инкубации
бульон, как правило,
остаётся прозрачным,
поскольку сибирез-
венный микроб обра-
зует на дне рыхлый
осадок, внешне
напоминающий ко-
мок ваты (Рис. 21.1),
который не растворя-
ется при встряхива-
нии, но может рас-
пасться на мелкие

хлопья. Редко возможно появление диффузного роста, из-за кото-
рого при встряхивании образуются муаровые волны, а на поверх-
ности может наблюдаться кольцо пристеночного роста. Из бульон-
ной культуры делают высевы на чашки и инкубируют в течении 18–
20 часов.

Инкубированные чашки аккуратно вынимают из термостата в
положении, параллельном поверхности стола (пола). Переворачива-
ть их не рекомендуется из-за опасности возможного вытекания
конденсационной жидкости, скопившейся на крышке (именно по-
этому чашки помещались в термостат дном вверх). Если конденсата
много, то крышку меняют путём аккуратного переноса дна чашки с
культурой на новую крышку, после чего крышка с конденсатом
также аккуратно помещается в раствор дезинфектанта. На чашках
сибирезвенный микроб формирует плоские матово-серые шеро-
ховатые колонии (R-форма), края которых при небольшом увели-
чении образуют так называемую *львиную гриву* (Рис. 21.2). Такие

¹ Интересно, что штаммы, выделяемые из зоны вечной мерзлоты, не растут в жидких питательных средах, а на плотных, при температуре 37°C, колонии образуются лишь к концу третьих суток. При температуре инкубирования от 5 до 12°C рост возможен к 48 часу, а оптимум температурного роста располагается в диапазоне от 15 до 24°C.



Рис. 21.2. Колонии *B. anthracis* спустя 12 (слева) и 16 (среднее и справа) часов инкубации. Обратите внимание, что характерная «львиная грива» визуализируется, как при обычном освещении (среднее), так и в косопроходящем пучке света (справа)

колонии достаточно липкие и вязкие, их трудно снять петлёй, поэтому размятые петлёй колонии формируют сталагмит над поверхностью агара (*тест на цепкость*; **Рис. 21.3**). Следует оговориться, что шероховатые колонии формируют только вирулентные штаммы, тогда как неvirulentные формируют гладкие колонии (S-форма). Отобранные подозрительные колонии засевают и инкубируют в течении 18–20 часов.

Культуры, выросшие на инкубированных чашках, куда высевали бульонные культуры и подозрительные колонии, подлежат исследованию.

Для начала обезжиренные предметные стёкла, держа за рёбра, подписывают с одной из сторон карандашом и наносят петлёй на поверхность этой стороны стекла физиологический раствор таким образом, чтобы капли (их количество соответствует количеству мазков) не соприкасались друг с другом. Обычно наносят две капли. Далее обожжённой петлёй рядом с каплей наносят исследуемую культуру, плавными круговыми движениями растирают её и

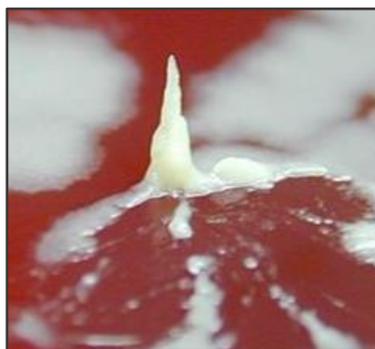


Рис. 21.3. Тест на цепкость культуры *B. anthracis*, выращенной на агаре с добавлением овечьей крови (SBA)

вносят в каплю, после чего, не обжигая петлю, из первой капли вносят во вторую каплю. Хотя это и не обязательно, таким образом можно получить менее густой мазок на случай, если первый окажется очень густым. Аккуратно укладывают полученный мазок на специальный планшет для предметных стёкол или чашку Петри с двумя спичками на дне для удобства взятия мазка, прикрыв крышкой до образования небольшой щели, чтобы мазки могли подсохнуть. Всё это, соответственно, располагается на поддоне с салфеткой, смоченной раствором дезинфектанта, рядом с горящей горелкой для соблюдения требований биологической безопасности. Строго запрещается подсушивать или фиксировать мазки в пламене горелки, поскольку это может привести как к спеканию исключительно поверхностно расположенных бактерий, так и к их аэрозольированию. Для фиксации мазки с помощью пинцета помещаются на полчаса в фиксирующую жидкость, для споровых культур состоящую из 96%-ного раствора этилового спирта и 6%-ной перекиси водорода. После фиксации мазки вынимают пинцетом и высушивают.

Мазки *окрашивают по Граму*¹, для чего наносят раствор генцианвиолета² на 1–2 минуты и тщательно смывают дистиллированной водой. Далее наносят раствор Люголя³ также на 1–2 минуты, смывают дистиллированной водой, на полминуты наливают 96%-ный раствор этилового спирта для обесцвечивания мазка и смывают дистиллированной водой. Наносят фуксин Пфейффера⁴ (или саф-

¹ Gram H. C. *Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schmitt- und Trockenpräparaten*. Fortschr Med. 1884; 2:185–189.

² **Способ приготовления:** растворить 1 г генцианвиолета в 10 мл 96%-ного раствора этилового спирта. Свежеприготовленный раствор перед использованием необходимо отстоять сутки при комнатной температуре или 2 часа при температуре 37 °С. Допустимо присутствие осадка.

³ Предложен французским врачом Жаном-Гийюмом Огюстом Люголем (Jean Guillaume Auguste Lugol; 1786–1851) в качестве препарата от туберкулёза. **Способ приготовления:** растворить 2 г йодида калия в 2 мл дистиллированной воды и после полного растворения добавить 1 г кристаллического йода. Энергично встряхивать до растворения йода, после чего добавить 300 мл дистиллированной воды, профильтровать.

⁴ Предложен немецким врачом Рихардом Фридрихом Иоганном Пфейффером (Richard Friedrich Johannes Pfeiffer; 1858–1945) как модификация способа немецкого врача Фрэнца Циля (Franz Ziehl; 1857–1926). **Способ приготовления:** к 1 г тщательно растёртого сухого основного фуксина прибавить небольшими порциями (растира-

ранин) на 1 минуту, промывают дистиллированной водой и высушивают. Предпоследний этап (последовательное нанесение раствора Люголя и этилового спирта) может быть несколько сложен для начинающих специалистов, поэтому рекомендуется¹ заменить его на однократное нанесение так называемого йодированного спирта, приготавливаемого путём смешения 2–4 мл 10%-ного спиртового раствора йода с 100 мл 95%-ного раствора этилового спирта. Кроме того, для равномерного распределения красителя по мазку целесообразно сначала положить пинцетом кусочек фильтровальной бумаги и уже потом на него наносить краситель.

Весьма интересна *модификация по Эткинсу*. Для окраски готовят два красителя. На фиксированный мазок наносят первый краситель, состоящий из 96%-ного раствора этилового спирта и 1%-ного водного раствора сульфата анилина² в соотношении 1 : 3, и через 1 минуту смывают дистиллированной водой. Наносят второй краситель, состоящий из 2 г кристаллического йода, растворённого в 10 мл 4%-ного раствора гидроксида натрия, и через 1 минуту наносят 96%-ный раствор этилового спирта для обесцвечивания. Через 5 минут наносят 10%-ный водный раствор сафранина, который смывают дистиллированной водой через 10 секунд.

В условиях мобильной лаборатории целесообразно использовать *модификацию по А. И. Синёву*. Для этого готовят раствор, состоящий из 1 г метилвиолета (или генцианвиолета), 5 мл глицерина и 100 мл 96%-ного раствора этилового спирта, которым после суточного отстаивания пропитывают полоски фильтровальной бумаги.

ется каждая порция) 5 г кристаллического фенола или добавить по каплям 5 мл 97%-ного водного фенола. Продолжая растирание, прибавить по 16–20 капель глицерина, затем 10 мл этилового спирта и довести небольшими порциями дистиллированной воды до 100 мл. Приготовленный раствор фильтруется (он должен иметь на поверхности плёнку металлического вида) и разводится дистиллированной водой в соотношении 1 : 10.

¹ Розанов Н. И. *Микробиологическая диагностика заболеваний сельскохозяйственных животных: Руководство для ветеринарных врачей диагностических лабораторий*. Москва: Государственное издательство сельскохозяйственной литературы, 1952, 508 с.

² **Способ приготовления:** к 100 мл 5%-ного водного раствора серной кислоты прибавить по каплям 20 мл технически чистого анилина (так называемое анилиновое масло). Выпавший рыхлый осадок отфильтровать и добавить в 30 мл 95%-ного раствора этилового спирта, после чего выпавший снова осадок отфильтровать и высушить. Далее растворить 1 г осадка в 100 мл дистиллированной воды.

Полученные полоски можно достаточно долго хранить в тёмной таре с притёртой пробкой. В отсутствие фильтровальной бумаги Натáлья Ники́форовна Клемпа́рская¹ предлагает использовать полоски газетной бумаги, пропитанные раствором, состоящим из 1 г генцианвиолета, 0,5 мл глицерина и 10 мл 96%-ного раствора этилового спирта. На фиксированный мазок наносят 2–3 капли дистиллированной воды, после чего с помощью пинцета накладывают полоску и слегка придавливают её к стеклу. Через 2 минуты полоску снимают и промывают мазок дистиллированной водой. Далее продолжают окраску по Граму с нанесения раствора Люголя, однако можно также использовать полоски, пропитанные соответствующими составами: для раствора Люголя – к 1 г кристаллического йода добавить 2,5 г йодида калия и 10 мл дистиллированной воды; для фуксина – к 0,1 г основного фуксина добавить 0,5 мл фенола.

В результате окраски обнаруживаются типичные однородные, довольно крупные палочки, окрашенные в фиолетовый цвет (Рис. 21.4). Это свидетельствует о том, что клеточная стенка сибиреязвенного микроба имеет дополнительный липополисахаридный (эндотоксический) слой (Рис. 2.8), прочно удерживающий фиолетовый краситель (генцианвиолет и йод) и не дающий спирту его обесцветить, что характерно для грамположительных бактерий (Г+). Обычно клетки располагаются длинными цепочками (Рис. 21.4-а).

Помимо культур также окрашивают фиксированные мазки из патологического материала (в том числе от биопробных животных). В этом случае могут обнаруживаться короткие цепочки, состоящие из палочек с резко обрубленными концами. В материале от животных наряду с типичными могут присутствовать толстые, вздутые, короткие или, наоборот, узкие и длинные палочки, а также редко кокковидные, нитевидные, спиралеобразные и даже колбообразные. В материале от людей встречаются короткие, толстые, изогнутые, реже зернистые палочки, вздутые посередине или на одном из концов (Рис. 21.4-b,c). Важно помнить, что в крови возбудитель обнаруживается лишь незадолго до смерти, и в этом смысле

¹ 1914–2003, советский врач, бактериолог.

наиболее «информативной» будет кровь, взятая незадолго до смерти и как можно быстрее после, поскольку в процессе разложения число сибиреязвенных бацилл быстро сокращается.

Для обнаружения капсулы используют окраску по М'Фадьюну¹. На всю поверхность фиксированного мазка наносят полихромный метиленовый синий² и выдерживают 30–60 секунд, после чего быстро промывают дистиллированной водой и высушивают. В результате бактериальные клетки окрашиваются в тёмно-фиолетовый цвет, а капсула – в красно-фиолетовый или розовый. В качестве альтернативы можно использовать метиленовый синий («синька») или весьма популярный в странах СНГ раствор Ребигера³ (иногда красят по Граму). Наиболее простой в исполнении видится окраска тушью, которую разводят в дистиллированной воде в соотношении 1 : 10. В этом случае мазок не промывают, а на тёмном фоне чётко визуализируется неокрашенное пространство вокруг бактерии (Рис. 21.5).

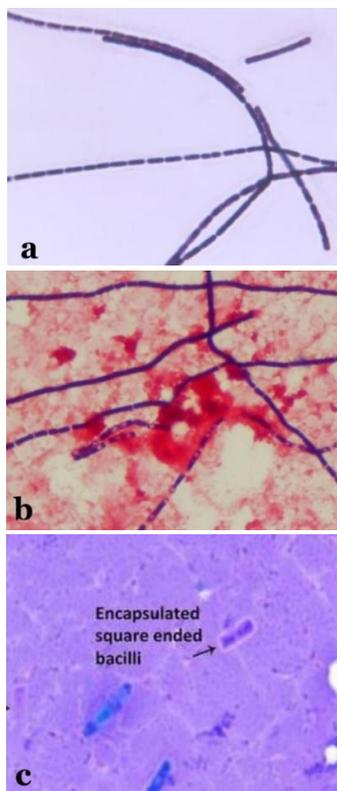


Рис. 21.4. Бактерии *B. anthracis*, окраска по Граму (b – по Russel L., 2013; c – по Lekota K. E., 2018): a – в мазке; b – в венозной крови (бактерии были инъецированы вместе с героином); c – в отёчной жидкости гепарда из Рис. 7.7

¹ M'Fadyean J. *A peculiar staining reaction of the blood of animals dead of anthrax.* J Comp Pathol Ther. 1903; 15:35–IN1.

² Получают путём нагревания водного метиленового синего с карбонатом натрия.

³ Способ приготовления: растворить 12–20 г генцианвиолета в 100 мл 40%-ного раствора формалина. Выдержать при комнатной температуре несколько часов, после чего профильтровать.

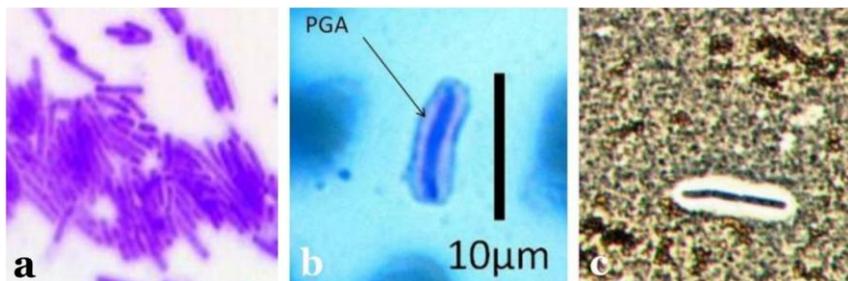


Рис. 21.5. Визуализация капсулы *B. anthracis* (a – по Котенева Е. А., 2023; b – по Boyer A. E., 2011): a – окраска по Ребигеру; b – окраска по М'Фадьюну (MFad); c – окраска тушью

Существуют и другие способы окраски. *Способ Михина*: метиленовый синий «по Лёффлеру»¹ наносят на фиксированный мазок и прогревают 2–3 минуты до образования паров, после чего быстро смывают дистиллированной водой (излишки воды вымывают краску из капсулы). В результате бактериальные клетки окрашиваются в тёмно-синий цвет, а капсулы – в светло-розовый. *Способ Кауфмана*: метиленовый синий «по Лёффлеру» наносят на фиксированный мазок на 2–3 минуты и смывают дистиллированной водой. Далее мазок погружают в 0,5%-ный раствор нитрата серебра (или 0,25%-ный водный раствор протаргола) на 3–4 минуты, после чего мазок вынимают и наносят на него карболовый раствор фуксина (в соотношении 1 : 20) на 5–10 секунд, обильно промывают дистиллированной водой и высушивают. В результате бактериальные клетки окрашиваются в тёмно-синий цвет, а капсулы – в тёмно-красный. *Способ Ионе*: на фиксированный мазок наносят 2%-ный водный раствор метилвиолета (или генцианвиолета) и подогревают 1–2 минуты. Затем быстро промывают небольшим количеством дистиллированной воды и обрабатывают 2%-ным водным раствором уксусной кислоты в течение 10 секунд, после чего промывают дистилли-

¹ **Способ приготовления:** растворить 3 г метиленового синего в 2 мл 96%-ного раствора этилового спирта, после чего прилить 1 мл 1%-ного раствора гидроксида калия и 100 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать. Приготовленная краска должна созреть несколько месяцев, поэтому для ускорения созревания её заливают в посуду наполовину, закрывая рыхлой ватной пробкой для лучшей аэрации. Созревший раствор устойчивый и может храниться, закрытый стеклянной или резиновой пробкой, несколько лет.

рованной водой и высушивают. В результате бактериальные клетки окрашиваются в тёмно-фиолетовый цвет, а капсулы – в розово-фиолетовый. *Способ Бурри – Гинса*: на предметное стекло наносят одну каплю туши, в которую вносят бактериальную культуру и дают подсохнуть. Затем мазок фиксируют, высушивают и красят фуксином Пфейффера или метиленовым синим «по Лёффлеру» в течение 5 минут, после чего обильно промывают дистиллированной водой и высушивают. В результате бактериальные клетки окрашиваются в синий цвет, а остаются неокрашенными на чёрном фоне мазка.

Визуализировать вегетативные клетки сибирезвённого микроба можно также *прямым методом флуоресцирующих антител*¹, который заключается в нанесении на исследуемый объект конъюгированного (т. е. соединённого) с флюорохромом антитела («люм-сыворотка»), специфичного к данному возбудителю. В результате соединения антитела с антигеном под действием облучения коротковолновыми лучами (люминесцентная микроскопия) искомые бактерии будут специфически светиться. Итак, на фиксированные мазки наносят сыворотку (сибирезвённые люминесцирующие адсорбированные соматические иммуноглобулины²) и помещают в чашку Петри с комочком влажной ваты (так называемая влажная камера), выдерживая 20 минут при 37 °С. Затем дважды тщательно промывают физиологическим раствором (по 10 минут), дистиллированной водой и высушивают. В случае, если мазок готовился из нативного материала, окрашивают смесью равных количеств сыворотки и альбумина, взятых в половине от рабочих разведений.

На окрашенный мазок наносят нелюминесцентное иммерсионное масло (допускается применение смеси физиологического раствора и химически чистого глицерина в соотношении 1 : 3) и микроскопируют с помощью люминесцентного микроскопа. Специфическим считают ярко-зелёное свечение клеточной стенки и капсулы (Рис. 21.6).

¹ Coons A. H., Kaplan M. H. *Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody.* J Exp Med. 1950; 91(1):1–13; DOI: 10.1084/jem.91.1.1.

² При исследовании мазков из клинических материалов, а также культур, выращенных на питательных средах, способствующих капсулообразованию, используют антикапсульные иммуноглобулины.

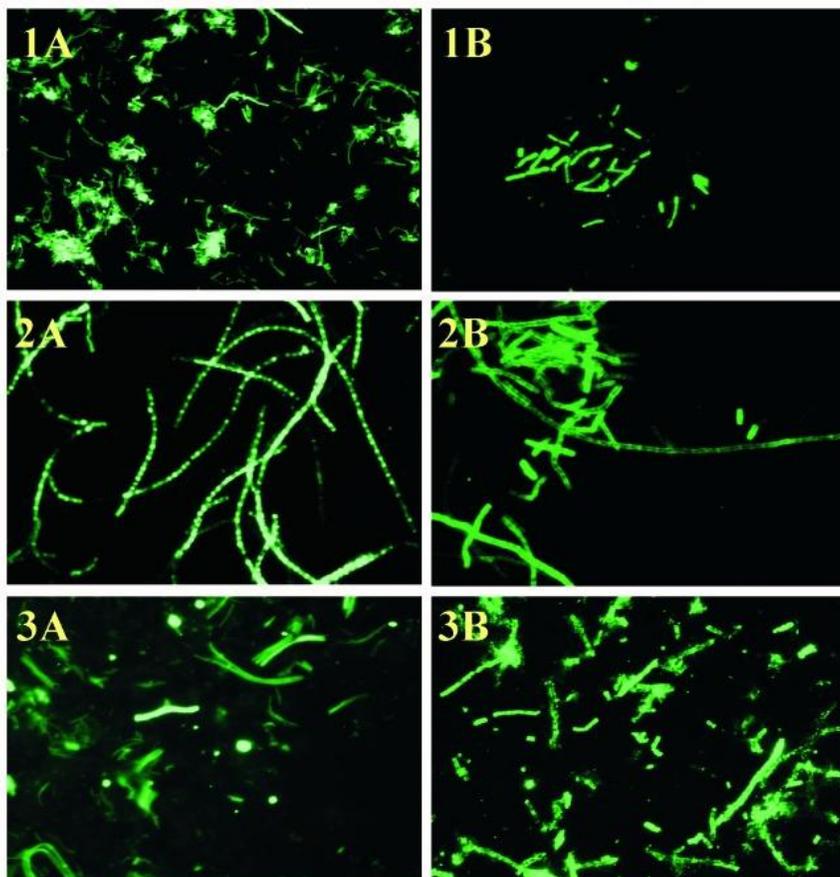


Рис. 21.6. Люминесцентное окрашивание клеточной стенки (А) и капсулы (В) штамма *B. anthracis* Pasteur (1), а также изолята 2002013601 из окружающей среды (2) и изолята 20020007069 из лёгочной ткани пациента (3), полученных во время Ameritrax (по De B. K., 2002)

Оценку результатов проводят по так называемой системе четырёх крестов:

4+	++++	яркая флуоресценция большого количества клеток, расположенных длинными цепочками, с очень яркой флуоресценцией по периферии клетки, чётко контрастирующей с тёмным телом клетки (положительный результат)
----	------	---

3+	+++	флуоресценция клеток, расположенных цепочками или единично, с яркой флуоресценцией по периферии клетки (положительный результат)
2+	++	слабая флуоресценция ободка клетки, слабо контрастирующая с её «телом» (отрицательный результат)
1+	+	очень слабая флуоресценция ободка клетки, не контрастирующая с её «телом» (отрицательный результат)

Выявление капсулообразования можно осуществить путём посева нескольких капель исследуемой культуры на сывороточный агар, бикарбонатный агар, бикарбонатно-сывороточный агар, среду Лёффлера, молочно-солевой агар или среду Green'a. Посевы инкубируют при 37 °С в атмосфере CO₂. Для этого используют CO₂-инкубатор или эксикатор, на дно которого устанавливают зажжённую свечу и накрывают притёртой крышкой (для поддержания горения израсходуется весь кислород, содержащийся в эксикаторе). Уже через полчаса-час инкубации начнётся капсулообразование, которое завершится к 18 часам (Рис. 21.7).

В случае использования среды ГКИ, названной в честь Государственного контрольного института им. Л. А. Тарасевича¹, пробирки с посевами закрывают стерильными резиновыми пробками и инкубируют в термостате при 37 °С.

Отсутствие подвижности определяют посевом исследуемой культуры в полужидкий агар (например, LB-агар) в виде прокола (Рис. 21.8)². Считается, что это важный дифференциальный признак, отличающий сибиреязвенный микроб от других представителей *B. cereus* complex, однако штаммы, не обладающие подвижностью, среди них всё же встречаются.

¹ Ныне в составе Научного центра экспертизы средств медицинского применения Министерства здравоохранения Российской Федерации.

² Ряд специалистов предлагает исследовать подвижность микроскопированием «висячей» или раздавленной капли, а также в камере Горяева, однако эти методы опасны с точки зрения биологической безопасности и при наличии более безопасного «прокола» видятся нецелесообразными.



Рис. 21.7. Слизистые колонии SM-формы, формируемые на среде Green'a (слева), а также мазки, окрашенные по Граму (справа сверху) и тушью (справа внизу), на которых чётко видно капсулы

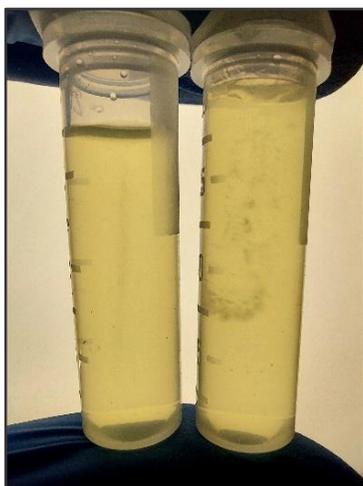


Рис. 21.8. Тест на подвижность: слева – *B. anthracis*; справа – отрицательный контроль (*B. cereus* ss)

Определение фосфатазной активности. На среду с 0,01%-ным раствором фенолфталеинфосфата натрия засевают исследуемую культуру. После суточной инкубации чашку с посевом переворачивают и на внутреннюю сторону крышки помещают фильтровальную бумажку, обильно смоченную водным раствором аммиака. В том случае, если бактерия образует фосфатазу, разлагающую фенолфталеинфосфат натрия до фенолфталеина, поднимающиеся вверх пары аммиака окрасят культуру в малиново-красный цвет (фенолфталеин в щелочной среде аммиака приобретает такой цвет). Но по-

сколько сибиреязвенный микроб фосфатазу не продуцирует или продуцирует в незначительном количестве, недостаточном для разложения фенолфталеинфосфата натрия, его колонии не окрасятся (другие почвенные бактерии, как правило, фосфатазу продуцируют).

Определение гемолитической активности. На поверхность кровяного агара или мясопептонного агара (или агара Хоттингера) с 3–5%-ной дефибринированной бараньей кровью наносят исследуемую культуру, после чего инкубируют при 37 °С в течение суток, за которые сибиреязвенный микроб не способен проявить гемолитическую активность. В дальнейшем гемолитическая активность проявляется (**Рис. 21.9**). Данный признак принято считать стабильным, однако следует помнить, что изменение состава среды (использование эритроцитов иных животных) может способствовать проявлению гемолитической активности уже на первые сутки. Для штаммов сибиреязвенного микроба характерен β -гемолиз, при котором происходит полный лизис эритроцитов в среде, что визуализируется в виде появления прозрачной зоны вокруг колоний. Однако встречаются штаммы, например, уже знакомый нам штамм Sterne, для которых характерен α -гемолиз, при котором эритроциты лизируются частично с сохранением клеточной стромы, а гемоглобин превращается в метгемоглобин, что проявляется зеленоватым оттенком среды в месте роста бактерий.



Рис. 21.9. Отрицательный (слева) и положительный (справа) тест на гемолитическую активность

Исследование на способность *разжижать желатин* (протеолитическую активность) проводят с помощью желатиновой среды, разлитой в пробирки «столбиком». Посев материала осуществляют проколом среды строго по центру, не доходя одного сантиметра до дна пробирки, после чего инкубируют 24 часа при комнатной температуре, наблюдая при положительной реакции разжижение среды по месту прокола. Если инкубировать посевы при 35–37 °С, то есть при температуре плавления желатина, то после охлаждения при положительной реакции не произойдёт затвердевания. Некоторые штаммы сибиреязвенного микроба проявляют протеолитическую активность.

Для совместного определения *гемолитической и протеолитической активности* используют двухслойный агар, в котором проделывают 6–7 лунок (на дно заливают по капле расплавленного 1%-ного агара). В лунки вносят по 0,1 мл двухсуточной бульонной культуры и инкубируют при 37 °С. Спустя 24 часа для учёта протеолитической активности поверхность агара обрабатывают 20%-ным раствором трихлоруксусной кислоты, что приводит к появлению зон просветления (**Рис. 21.10**). Учёт гемолитической активности проводят спустя 48 часов инкубации.

Определение лецитиназной активности. Суточную культуру высевают «бляшкой» или «змейкой» («жирненько») на поверхность мясопептонного агара (или агара Хоттингера) с яичным желтком и инкубируют при 37 °С. Большинство штаммов сибиреязвенного микроба не сворачивают желток, поэтому в течение 2–3 суток вокруг посева не наблюдается мутной белой зоны, хотя встречаются и исключения.

Культуры сибиреязвенного микроба исследуют на чувствительность к пенициллину *тестом «жемчужного ожерелья»*¹. В три пробирки разливают по 10 мл предварительно остуженного до 45 °С 2%-ного питательного агара. В первую и вторую пробирки добавляют соответственно 0,05 и 0,5 ЕД/мл пенициллина, а третью оставляют в качестве контроля. Содержимое пробирок выливают в чашки Петри, размечают на сектора и в каждый сектор вносят по капле исследуемых 3–6-часовых бульонных культур (не более 10), после

¹ Об исследовании антибиотикочувствительности поговорим в Главе 24.

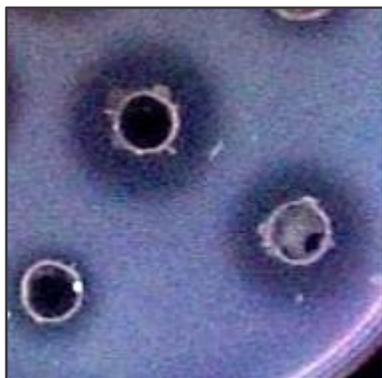


Рис. 21.10. Протеолитическая активность в виде зон просветления вокруг лунок



Рис. 21.11. Сибиреязвенный микроб в виде «жемчужного ожерелья»

чего инкубируют при 37°C в течение 3 часов. Далее на каждый сектор аккуратно помещают покровное стекло и исследуют под иммерсионным маслом. На средах, содержащих пенициллин, клетки сибиреязвенного микроба будут иметь округлую форму, напоминающую жемчужины, как бы собранные в ожерелье за счёт характерного для *B. anthracis* цепочечного расположения (**Рис. 21.11**).

Можно видеть, что этот способ достаточно сложен в исполнении с точки зрения обеспечения биологической безопасности, поэтому на практике чаще всего пользуются *модификацией по Е. В. Груз*. В две пробирки с бульоном Хоттингера (рН 7,2) приливают 20%-ную инактивированную лошадиную сыворотку и соответственно по 0,05 и 0,5 ЕД/мл пенициллина. Содержимое переливают в две пробирки по 2–3 мл, а в третью пробирку – 2–3 мл бульона Хоттингера (контроль). Засевают по две капли исследуемой бульонной культуры или вносят петлёй исследуемую агаровую культуру, после чего инкубируют при 37 °С в течение 3 часов. Далее делают мазки, которые после фиксации окрашивают как при исследовании капсулы (по М'Фадьену, Ребигеру и т. д).

Многие штаммы сибиреязвенного микроба чувствительны к диагностическим бактериофагам, в частности, уже упоминаемому гамма-фагу, а также «К», Фаh-ВНИИИВВиМ и другим. Чувствительность культуры к бактериофагам проверяют путём её посева в

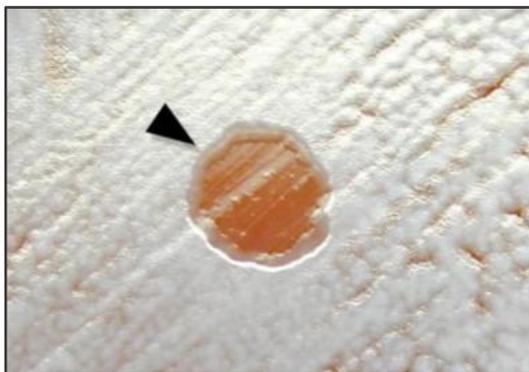


Рис. 21.12. Зона лизиса, образованная литическим действием гамма-фага на культуру сибиреязвенного микроба

виде агаровой культуры (или 3–6-часовой бульонной культуры) «сплошным газоном» на чашку, куда затем вносится одна капля бактериофага¹, после чего чашка инкубируется при 37 °С не менее 6 часов. В случае положительного результата на месте нанесения капли бак-

териофага будет обнаруживаться полное (или частичное) отсутствие роста бактериальной культуры в виде округлого просветления (Рис. 21.12). Следует помнить, что специфичность фагового теста (т. е. отношение полученного результата к истинному результату) составляет всего 97 %, то есть могут быть ложноположительные и ложноотрицательные результаты, поскольку, с одной стороны, имеются штаммы сибиреязвенного микроба, не лизирующиеся диагностическими фагами (в частности, «проникновению» фага может препятствовать капсула), а, с другой стороны, существуют почвенные бактерии, лизирующиеся сибиреязвенными фагами. В частности, при изучении почвенных изолятов выяснилось², что чувствительностью к гамма-фагу обладают штаммы, относящиеся не только к *B. cereus* complex, но и к иным *Bacillus* spp., *Lysinibacillus* spp. и *Solibacillus silvestris*.

Вернёмся к культивированию культур, подлежащих исследованию. Всё это время мы говорили про исследование вегетативных клеток, то есть культур, которые инкубировались примерно сутки, однако если инкубировать 2–5 дней, то в отсутствие питательных

¹ Некоторые специалисты рекомендуют, слегка приподняв чашку, дать капле стечь, чтобы сформировать так называемую фаговую дорожку.

² Kolton C. B., Podnesky N. L., et al. *Bacillus anthracis* gamma phage lysis among soil bacteria: an update on test specificity. BMC Res Notes. 2017; 10(1):598; DOI: 10.1186/s13104-017-2919-8.

веществ (их поедания бактериями) на воздухе, как Вы знаете, клетки перейдут в споровое состояние. Исследуют и их.

Для начала готовят мазки, которые фиксируют и окрашивают. Существует большое количество способов окраски, но самая популярная на сегодняшний день – по Циллю – Нильсену. На фиксированный мазок наносят карболовый фуксин Циля¹ и подогревают до образования паров (не доводить до кипения), после чего прогревание прекращают и оставляют мазок на 2–3 минуты. Промывают дистиллированной водой и наносят 5–10%-ный раствор серной кислоты (или 5%-ный раствор азотной кислоты, или 3%-ный раствор соляной кислоты) для обесцвечивания в течение 3–5 секунд (до появления желтоватого оттенка), после чего тщательно промывают дистиллированной водой, ополаскивают 96%-ным раствором этилового спирта в течение 5–10 секунд² и снова промывают дистиллированной водой. Наносят метиленовый синий «по Лёффлеру» (или 0,1%-ным раствором малахитового зелёного) на 2–3 минуты, промывают дистиллированной водой и высушивают. В результате бактериальные клетки окрашиваются в синий цвет, а споры – в розовый с интенсивной окраской по периферии (жизнеспособные), в красный (слабо жизнеспособные) или синий (нежизнеспособные). Однако на практике такой картины бывает добиться крайне сложно, особенно начинающим специалистам (Рис. 21.13-б).

В условиях мобильной лаборатории, как и в случае окраски по Граму, целесообразно использовать *модификацию по А. И. Синёву*. Для этого фильтровальную бумагу пропитывают 2%-ным раствором основного фуксина, сушат и нарезают на полоски, которые хранят в тёмной таре с притёртой пробкой. На фиксированный мазок наносят 2–3 капли дистиллированной воды, накладывая с помощью пинцета полоску, слегка придавливая её к стеклу, и подогревают мазок до появления паров, после чего прогревание пре-

¹ Способ приготовления: тщательно растереть в ступке 1 г основного фуксина и 5 г фенола (кристаллического) с несколькими каплями глицерина. При этом, постоянно помешивая, по каплям влить 10 мл 95%-ного этилового спирта и 100 мл дистиллированной воды. Выдержать 2–3 суток.

² Вместо кислот и спирта советский врач, бактериолог Николай Александрович Розанов (? – ?) рекомендует использовать смесь, состоящую из 3 мл соляной кислоты и 97 мл 96%-ного раствора этилового спирта.

крашают и оставляют мазок на 2–3 минуты. Далее продолжают окраску по Цилю – Нильсену с промывки дистиллированной водой и обесцвечивания.

Существуют и другие способы окраски. *Способ Пешкова*: на фиксированный мазок наносят метиленовый синий «по Лёффлеру» и нагревают над пламенем горелки (до кипения) в течение 20 секунд. Далее мазок промывают дистиллированной водой и наносят 0,5%-ный водный раствор нейтрального красного на полминуты, после чего обильно промывают дистиллированной водой и высушивают. В результате бактериальные клетки окрашиваются в розовый цвет (хроматиновые элементы протоплазмы могут окрашиваться в фиолетовый), а споры – в голубой или синий (молодые споры могут окрашиваться в чёрный). *Способ Мюллера*: на фиксированный мазок наносят 5%-ный водный раствор хромовой кислоты на 1–3 минуты, после чего промывают дистиллированной водой и слегка просушивают. Наносят раствор фуксина и нагревают до появления паров в течение 3–4 минут. Наносят 5%-ный водный раствор серной кислоты на 5 секунд для обесцвечивания и промывают дистиллированной водой. Наносят метиленовый синий «по Лёффлеру» на 1–2 минуты, после чего обильно промывают дистиллированной водой и высушивают. В результате бактериальные клетки окрашиваются в синий цвет, а споры – в красный. *Способу Виртца*: на фиксированный мазок наносят смесь, состоящую из 5%-ного водного раствора малахитового зелёного и 5%-ного глицерина, и прогревают в течение 1 минуты до появления паров (примерно 3–4 раза). После остывания мазок промывают дистиллированной водой и наносят 0,5%-ный водный раствор сафранина. Через 30–40 секунд мазок промывают дистиллированной водой и высушивают. В результате бактериальные клетки окрашиваются в красный цвет, а споры – в тёмно-зелёный (лежащие в материнской клетке) или зеленовато-голубой (свободнолежащие). В *модификации Савватёва* вместо нанесения красок непосредственно на мазок используют заранее приготовленные фильтровальные бумажки, пропитанные краской¹, которые кладут на мазок с предварительно нанесёнными на него 2–3-мя каплями дистиллированной воды. В *модификации Шёффера* и

¹ После пропитки бумажки высушивают (желательно при 50 °С), после чего хранят в закрытой таре в тёмном месте.

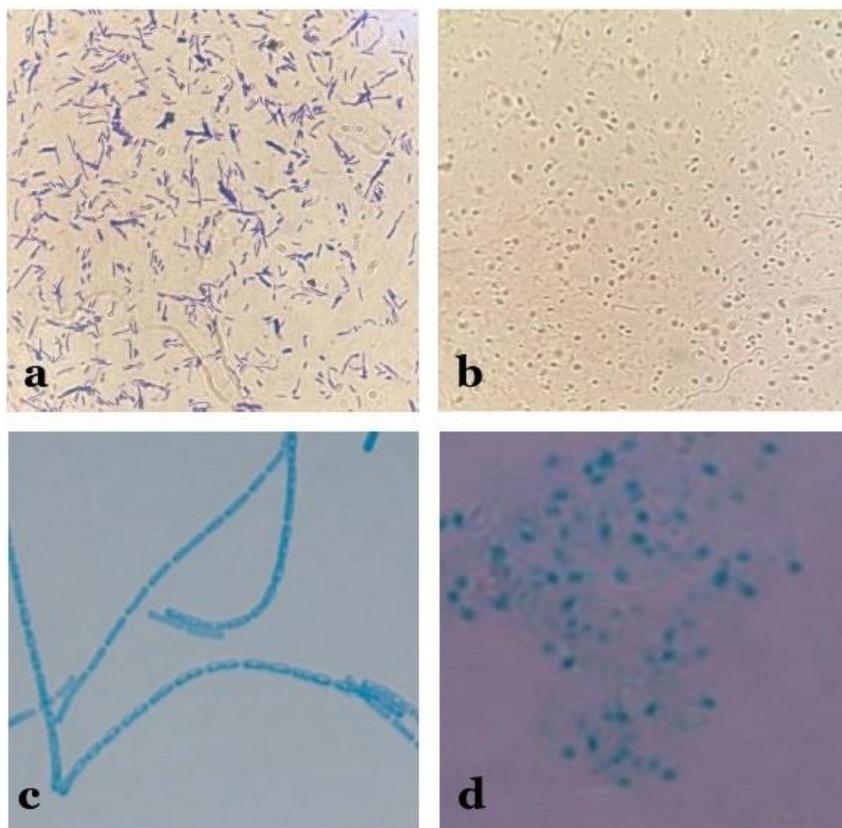


Рис. 21.13. Визуализация спор методом (b) «раздавленная капля» и окрасками (a) по Цилю – Нильсену, (c) кумасси синим и (d) малахитовым зелёным (d – по Zhang P., 2020)

Фултона используют малахитовый зелёный без глицерина, из-за чего лежащие в материнской клетке споры уже не визуализируются. Окрашивают и одним малахитовым зелёным, но это не очень эффективно (**Рис. 21.13-d**).

Можно видеть, что существующие способы окраски (и их модификации) сложны и весьма опасны получениями ожогов при работе с кипящими химикатами. В этой связи некоторые специалисты рекомендуют исследовать споры в раздавленной капле (**Рис. 21.13-a**), что уже опасно с точки зрения обеспечения биологической без-

опасности, поэтому видится целесообразным применять способ окраски, разработанный¹ сотрудниками Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии (Оболенск) и автором этой книги. На фиксированный мазок наносят 0,1–1%-ный раствор кумасси синий G в 50%-ной уксусной кислоте на полчаса, после чего промывают дистиллированной водой и высушивают. В результате бактериальные клетки окрашиваются в светло-синий цвет, а споры остаются прозрачными (Рис. 21.13-с).

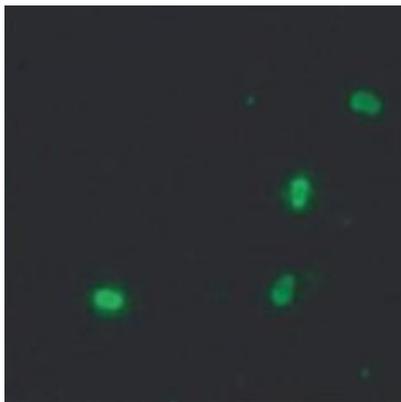


Рис. 21.14. Люминесцентное свечение спор сибиреязвенного микроба (по Kubler-Kielb J., 2008)

Визуализируют споры также прямым методом флуоресцирующих антител, как было описано ранее, но с использованием диагностического люминесцирующего адсорбированного антиспорового иммуноглобулина (Рис. 21.14).

Для определения способности к росту на минимальной питательной среде исследуемые споры засевают на среду «9АТ» и инкубируют при температуре 37 °С. Если к 48-му часу роста не наблюдается, то исследуемый штамм считается нуждающимся в дополнительных факторах роста. В качестве контроля используют известные штаммы, например, Ames или 81/1.

Дифференцировку культур по вирулентности (*in vitro*) осуществляют путём посева петлёй бляшками диаметром 3–4 мм суспензии спор или вегетативных клеток из суточной агаровой культуры на чашку со средой, содержащей противосибиреязвенный глобулин (например, средой «СОПЭК»), и на чашку с агаром Хоттингера (по 10–50 инокулятов). Параллельно, в качестве контроля, засевают: (1) культуру, достоверно продуцирующую капсулу и токсин (например, штамм Ames или 81/1); (2) культуру бесплазмидного штамма;

¹ Хлопова К. В., Горшков-Кантакузен В. А., и др. К вопросу визуализации параспоральных тел и спор. Международный вестник ветеринарии. 2025. 3:84-89; DOI: 10.52419/issn2072-2419.2025.3.84.

(3) культуру, продуцирующую капсулу на воздухе (т. е. с CO₂-независимым механизмом синтеза). Чашку со средой, содержащей противосибирезвенный глобулин, помещают в микроанаэростат (75 % воздуха) или CO₂-инкубатор (10 % CO₂) и инкубируют при 37 °С в течение 48 часов, после чего вынимают из микроанаэростата (CO₂-инкубатора) и культивируют при 0–4°С (холодильник) в течение 1–3 суток. Чашку со средой Хоттингера и инкубируют при 37 °С в течение суток.

По окончании инкубирования чашки просматривают, регистрируя морфологию колоний. Шероховатые колонии с волокнистым краем (R-форма) характерны для штаммов, не продуцирующих капсулу, тогда как гладкие, блестящие колонии (SM-форма) – для продуцирующих. Для подтверждения капсулообразования далее проводят окраску (по М'Фадьену, Ребигеру). Чашку со средой, содержащей противосибирезвенный глобулин, дополнительно просматривают на тёмном фоне для обнаружения колоний с характерным ореолом в виде тонких колец преципитации, свидетельствующих о токсинообразовании. Предварительную оценку проводят после 48-часового инкубирования, когда чашки переносят в холодильник. Учёт результатов представлен в **Табл. 21.1**.

Интересно, что ещё в 1960 году было предложено¹ подразделять все штаммы сибирезвенного микроба на типы. К **I типу** были отнесены штаммы, формирующие колонии R-формы на воздухе и SM-формы в атмосфере CO₂ (на бикарбонатной среде), и только в ней синтезирующие капсулу. Преимущественно это вирулентные штаммы. Ко **II типу** – штаммы, в любых условиях формирующие SM-форму и синтезирующие капсулу. Наконец, к **III типу** – штаммы, в любых условиях формирующие R-форму и не синтезирующие капсулу. Оба этих типа авирулентны. Считается, что III тип возникает спонтанно из I типа, поскольку последний склонен к диссоциации. Это явление особенно хорошо видно при культивировании на среде Green'a (10–75 % CO₂). Выросшие колонии выглядят слизистыми, но постепенно среди них образуются колонии с «шероховатыми выростами» (**Рис. 21.15**), что объясняется селектив-

¹Thorne C. B. *Biochemical properties of virulent and avirulent strains of Bacillus anthracis*. Ann NY Acad Sci. 1960; 88:1024–1033; DOI: 10.1111/j.1749–6632.1960.tb20094.x.

ным преимуществом, появляющимся у бактерий этого типа при данных условиях культивирования.

Табл. 21.1. Интерпретация результатов (оценка вирулентности *in vitro*)

Чашка со средой, содержащей противосибирезвенный глобулин		Чашка с агаром Хоттингера	Интерпретация
капсула	токсин	капсула	
+	+	–	Высоковирулентный штамм
+	–	–	Умеренно вирулентный штамм
+	–	+	Слабо вирулентный штамм
–	+	–	Авирулентный штамм
–	–	–	Апатогенный штамм



Рис. 21.15. Диссоциация штамма на среде Green'a. Обратите внимание на крупные единичные колонии R-формы на фоне маленьких слизистых колоний SM-формы

С целью долгосрочного хранения выделенной культуры последнюю отсеивают на питательные среды, способствующие спорообразованию (мясопептонный агар, агар Хоттингера, голодный агар, голодный пшеничный агар, голодный гороховый агар), после чего инкубируют в течение 4–7 суток при 37 °С, контролируя процесс спорообразования путём приготовления мазков и их окрашивания. По достижении 95–100 % спорообразования¹ культуру смывают дистиллированной водой и отстаивают в течение 3 суток (за это время должны погибнуть потенциально оставшиеся вегетативные клетки). Далее аккуратно удаляют надсадочную жидкость и приливают 30–50%-ный глицерин (химически чистый). В таком виде, в запаянных ампулах, споры могут храниться в течение нескольких лет при 4–8 °С.

Исследование выделенной культуры возбудителя на животных является неотъемлемой частью лабораторной диагностики. Работают с животными в специальных помещениях «заразной» зоны лаборатории, именуемых блоком для работы с инфицированными животными, которые отделяют от остальных помещений предбоксом (двери блока дополнительно оборудуются порогом не менее 30 см). В состав блока входят помещения для приёма животных из вивария, помещения для заражения, содержания и вскрытия животных, а также помещения для обеззараживания инвентаря. Несложно догадаться, что, как и в случае лаборатории, блок подразделяют на уровни и в нашем случае работы выполняют в блоке не ниже **третьего уровня** безопасности животных или ABSL-3 (от англ. Animal Biosafety level), соблюдая принцип парности². Все манипуляции проводят в противочумном костюме I типа (аналог),

¹ Следует иметь в виду, что для штаммов, выделенных из зоны вечной мерзлоты, эффективность закладки жизнеспособных спор составляет менее 30%.

² Подробнее о вивариях и блоке для работы с инфицированными животными читайте в Главе 34 Оперы о чуме.

дополненном высокими сапогами, прорезиненным фартуком, нарукавниками и щитком.

В предыдущей главе мы говорили о пробоподготовке материала для посева на питательные среды. Этим же материалом параллельно заражают и биопробных животных, в качестве которых используют белых беспородных мышей, морских свинок или золотистых сирийских хомячков. Последние животные предпочтительнее, поскольку менее подвержены действию посторонней микрофлоры (мышь быстро умирает от сопутствующей инфекции, например, попавшей из корма) и им не свойственен разброс в индивидуальной реакции (как морским свинкам¹), а также патологоанатомическая картина при сибирской язве у них более выраженная (Рис. 22.1). Однако надо учитывать, что молодые особи более устойчивы к действию возбудителя, и инфекционный процесс у них может протекать без видимых патологоанатомических изменений, поэтому при выборе золотистых хомячков в качестве биопробного животного приоритет следует отдавать более старшим особям (старше 3–4 месяцев).

Подготовленный материал суспендируют в небольшом объёме физиологического раствора и вводят подкожно в районе паха (в проекции лимфатического узла) или во внутреннюю поверхность бедра двум животным (прогретый и непрогретый материал): по 0,2–0,5 мл в случае использования мышей и по 0,5–1 мл в случае использования морских свинок и золотистых хомячков. Для этого исследуемый материал аккуратно набирают в шприц. Для удаления попавших пузырьков воздуха аккуратно двигают поршнем вперёд-назад (не допуская вытекания из иглы!), чтобы они переме-

¹ Следует отметить, что многие специалисты отдают предпочтение морским свинкам, поскольку в их случае к летальному исходу могут привести не только штаммы, синтезирующие лишь один токсин (летальный или отёчный), но и даже те, что не способны синтезировать протективный антиген (РА-негативные). Вместе с тем они оказываются невосприимчивыми к некоторым атипичным штаммам сибиреязвенного микроба, в частности к штаммам с особыми питательными потребностями, к которым чувствительны другие животные. Кроме того, у них снижена восприимчивость к вакцинам на основе протективного антигена (AVA, AVP), но повышена чувствительность к некоторым антибиотикам. С другой стороны, они являются наиболее удачной моделью для исследования иммуногенных свойств адъювантов при вакцинации, поскольку полученные на них данные наиболее адекватно экстраполируются на человека.



Рис. 22.1. Патологоанатомическая картина, характерная для сибиреязвенной инфекции у морской свинки (слева) и золотистого сирийского хомячка (справа), погибших на 2-е сутки инфекционного процесса (подкожное заражение). Можно видеть более выраженную патоморфологическую картину у хомячка, у которого обильнее кровенаполнено место инъекции

стились в район подыгольного конуса, после чего пинцетом на иглу накалывают небольшой стерильный бумажный пакетик с ватой или марлей, в который выгоняют воздух. Оставляют пакетик на иголке шприца непосредственно до момента заражения животного. Запрещается постукивать по цилиндру шприца или «спускать» воздух в раствор дезинфектанта.

Чистое животное, подготовленное для заражения, фиксируют. *Фиксация мыши* осуществляется путём извлечения из клетки (поимки за хвост) одной рукой и захвата другой рукой за холку защищающим движением, при котором ушки животного прижимаются большим и указательным пальцами. Другая рука продолжает держать за хвост, слегка растягивая мышшь. *Фиксация морской свинки* осуществляется путём захвата её одной рукой за спинку (под грудь), при этом большой и указательный пальцы охватывают шею, а остальные фиксируют конечности. Другой рукой удерживают зад-

нюю часть тела, обездвиживая конечности. *Фиксация золотистого хомячка* в целом похожа на фиксацию мыши, но надо помнить, что хомячок более вёрткий и не имеет хвоста, поэтому его извлечение из клетки обычно осуществляют корнцангом за холку; другим корнцангом оттягивают заднюю лапку, противоположную месту введения инъекции. Однако целесообразнее использовать плотные перчатки (краги), защищающие от порезов и укусов, которыми ловят хомячка, после чего, удерживая за холку, фиксируют передние лапки.

Фиксированное животное подаётся в горизонтальном положении (хомячки – брюшком вверх). Экспериментатор в одну руку берёт шприц, а другой при помощи пинцета снимает пакетик с иглы шприца и опускает его в контейнер с раствором дезинфектанта. Этим же пинцетом берут тампон, смоченный физиологическим раствором, и протирают место инъекции, после чего кладут его на руку напарника, удерживающего животное, чтобы после заражения не производить лишних движений. В случае введения *в паховую область* защищают пинцетом кожу животного и несколько оттягивают (приподнимают вверх) до образования треугольной складки. Шприц с материалом удерживают горизонтально и, не меняя положения, вводят иглу в центр складки, после чего надавливают на поршень шприца, вводя содержимое. В случае введения *во внутреннюю поверхность бедра* оттягивают лапу (в случае хомячков оттягивают обе задние лапы¹) животного (пинцетом или рукой), после чего вводят иглу шприца под углом 15° и надавливают на поршень шприца, вводя содержимое (Рис. 22.2-а). Данную манипуляцию следует проводить аккуратно, чтобы не проколоть мышцу или брюшину, особенно у хомячков, чья кожа достаточно плотная и подвижная (для удобства шерсть можно заранее состричь). После введения содержимого пинцетом берут тампон, накрывают им место инъекции и вытаскивают иглу из кожи. Животное помещают обратно в клетку, а в шприц набирают раствор дезинфектанта и сбрасывают его в контейнер.

¹ Оттягивание только одной лапы может привести к тому, что хомячок вывернется, даже будучи фиксированным. Поэтому целесообразно, чтобы одной рукой фиксировали передние лапы, а другой оттягивали лапу, противоположную к месту инъекции. Экспериментатор же свободной рукой оттягивает оставшуюся лапу.

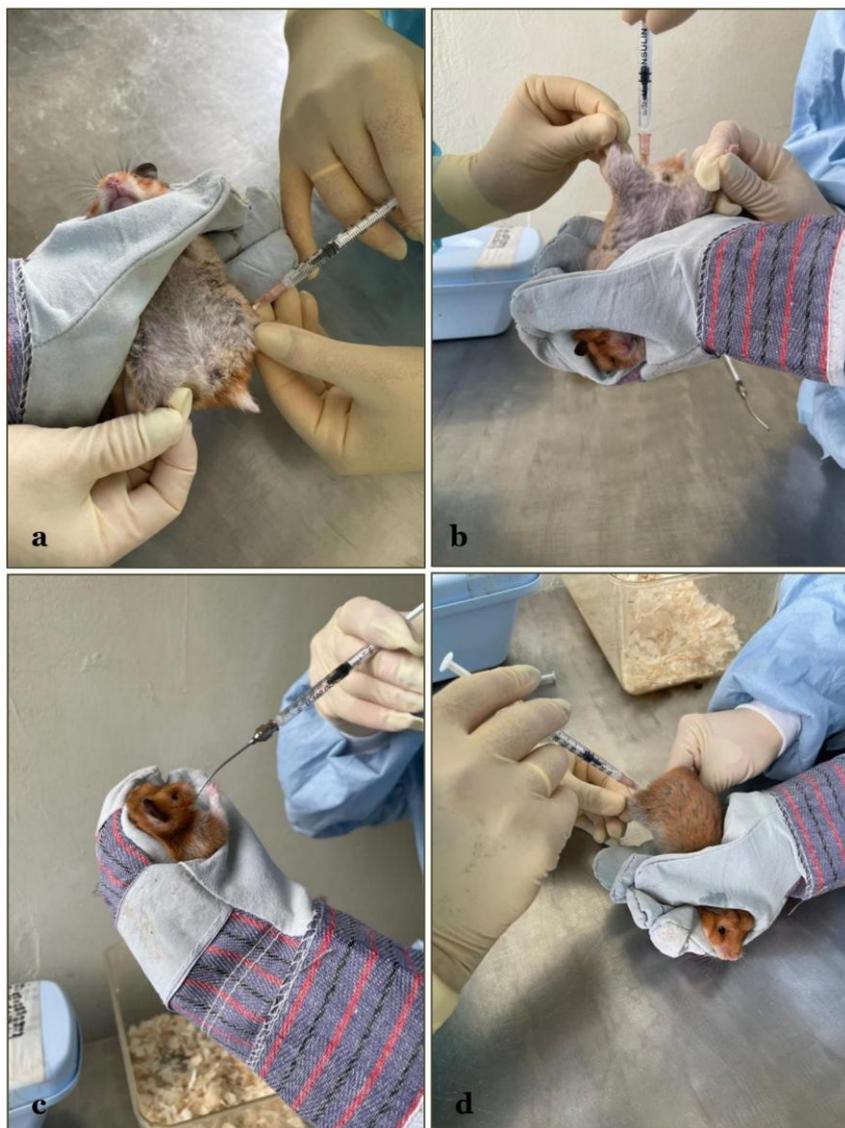


Рис. 22.2. Подкожное (а), внутрибрюшинное (б), пероральное (с) и внутримышечное (д) заражение хомячка



Рис. 22.3. Скарификация кожи (насечки) для заражения методом втирания

В качестве альтернативы золотистых хомячков можно заражать методом втирания в кожу (австрийский метод). Для этого у животного выбривается часть тела на спине (2 x 3 см) и смачивается физиологическим раствором. Использовать раствор дезинфектанта строго запрещается, поскольку это может привести как к гибели исследуемого микроорганизма, так и к лишнему стрессированию животного. Животное подают строго горизонтально (спинкой вверх), чтобы исключить риск падения (соскальзывания) материала и его разбрызгивание. Кожу скарифицируют (**Рис. 22.3**), и на её поверхность с помощью пипетки наносят исследуемый материал, аккуратно втирая плавными движениями тупой стороной скальпеля под прикрытием чашки Петри.

Обычно гибель заражённых мышей наступает в первые двое суток, а морских свинок и хомячков – на третьи сутки или дольше. Если животное не пало на десятые сутки, его подвергают эвтаназии. Павшие и подвергнутые эвтаназии животные подлежат патолого-анатомическому исследованию (вскрытию), которое проводят в соответствующем помещении блока – вскрыточной (секционной).

Для вскрытия подготавливают подложку (чаще деревянную), на которой размещают салфетку, обильно смоченную раствором дезинфектанта, ватные шарики (3 штуки), иглы для фиксации животного, ёмкость (стакан) с 96%-ным раствором этилового спирта, в которой помещаются ножницы и анатомический пинцет (хирургический может порвать ткани), а также спиртовку, корнцанг и контейнер с раствором дезинфектанта. Перед началом работы следует особое внимание уделить ножницам, которые должны быть острыми и иметь закруглённые бранши, поскольку от этого зависит качество выполняемой работы.

Процесс вскрытия лабораторного животного (хомячка) показан на схеме (**Рис. 22.4**), для наглядности дополненной фотографиями,

и сводится к следующим этапам (номер этапа совпадает с номером на схеме и фотографиях):

1. С помощью корнцанга хомячка укладывают на расположенную на подложке салфетку, смоченную раствором дезинфектанта, брюшком вверх, после чего фиксируют конечности, слегка растягивая позвоночник. Подготавливают три ватных шарика, смоченных раствором дезинфектанта: одним, с помощью пинцета, обильно протирают место вскрытия (брюшко хомячка); вторым, сложенным в виде лодочки, прикрывают отверстие мочеиспускательного канала и используют для укладки в него извлекаемых органов; третий используют для очистки инструментария (пинцета и ножниц) от крови и шерсти животного.
2. Обработывают инструментарий фламбированием (окунают в ёмкость с 96%-ным раствором спирта и обжигают в пламени горелки; во избежание возгорания спирта в ёмкости следует размещать спиртовку на расстоянии), после чего в районе лобкового сочленения приподнимают кожу пинцетом и делают надрез ножницами. Далее бранши ножниц в сомкнутом виде вводят в пространство между кожей и брюшной стенкой по проекции средней линии до грудины и выводят, аккуратно размыкая их и смыкая таким образом, чтобы кожа отделилась от брюшной стенки.
3. Обработывают ножницы фламбированием и разрезают ими кожу по типу конверта (синяя линия) или фартука (красная линия), после чего её отгибают. На данном этапе оценивается состояние лимфатических узлов.
4. Обработывают ножницы фламбированием и разрезают брюшную стенку, повторяя операции 2 и 3.
5. Оценивают состояние внутренних органов.
6. При необходимости разрезают предварительно фламбированными ножницами грудную клетку (перекусив ножницами шейные позвонки, можно петлёй по позвоночному каналу взять образцы головного мозга), а также вскрывают черепную коробку для оценки мозга.

У павших от сибирской язвы животных в месте введения материала обнаруживается студенистый геморрагический отёк под-

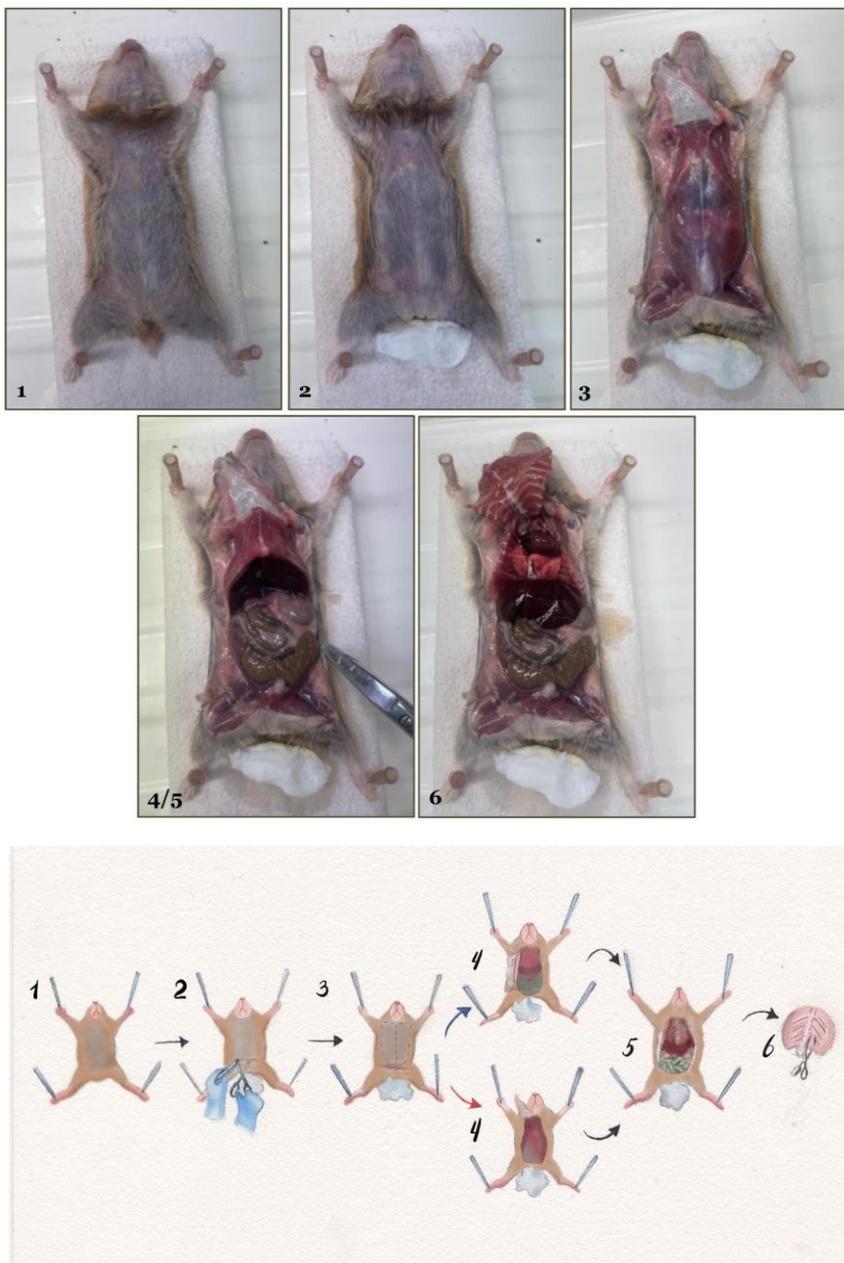


Рис. 22.4. Процесс патологоанатомического исследования лабораторного животного (хомячка)

кожной клетчатки, который может затрагивать паховый лимфатический узел (Рис. 22.1 и Рис.22.4-3). Внутренние органы гиперемированы, селезёнка увеличена, а кровь местами несвёрнутая. Однако в жизни всё несколько сложнее. Так, у морской свинки, как говорилось ранее, могут отсутствовать какие-либо поражения (Рис. 22.5), тогда как у хомячков, напротив, патоморфологическая картина выраженная, но отличная от описанной: брюшная полость вздута и заполнена желеподобным экссудатом (Рис. 22.1 и Рис.22.6). Его так много, что в последние часы жизни «раздутый» хомячок не может шевелить задними лапами и передвигается (ползает) исключительно на передних! Видимых поражений органов нет, за исключением незначительного истощения селезёнки, но поскольку она изначально небольшая, заметить эти изменения бывает сложно.

Тем не менее для посевов на плотные питательные среды и приготовления мазков-отпечатков (с целью последующей окраски и микроскопирования) исследуют не только желеподобный экссудат и лимфатический узел, но также селезёнку, печень, сердце (кровь) и при необходимости лёгкие и головной мозг. Для этого используют предварительно фламбированные и тщательно остуженные пинцет и ножницы: от удерживаемого пинцетом органа отрезается ножницами фрагмент и свежим срезом делается несколько отпечатков по агару или стеклу. На агар, разделённый на секторы, обычно делают по два-три отпечатка. На стекло делают один отпечаток печени, два отпечатка лёгких, три отпечатка селезёнки, четыре отпечатка лимфатического узла и один мазок сердца (для этого отрезают верхушку сердца и отрезом проводят по стеклу), после чего стёкла помещают в фиксирующую жидкость на полчаса и окрашивают. Не забудьте, что фиксирующая жидкость состоит из смеси 96%-ного раствора этилового спирта и 6%-ного раствора перекиси водорода.

После завершения исследования при помощи пинцета ватные диски помещают на животное, снимают фиксаторы с конечностей и заворачивают углы салфетки конвертиком. Далее обёрнутое в салфетку животное с помощью пинцета помещают в контейнер для последующего обеззараживания и сжигания. Салфеткой, смоченной в растворе дезинфектанта, обрабатывается подложка (с обеих сторон) и поверхность стола, на которой она размещалась. В

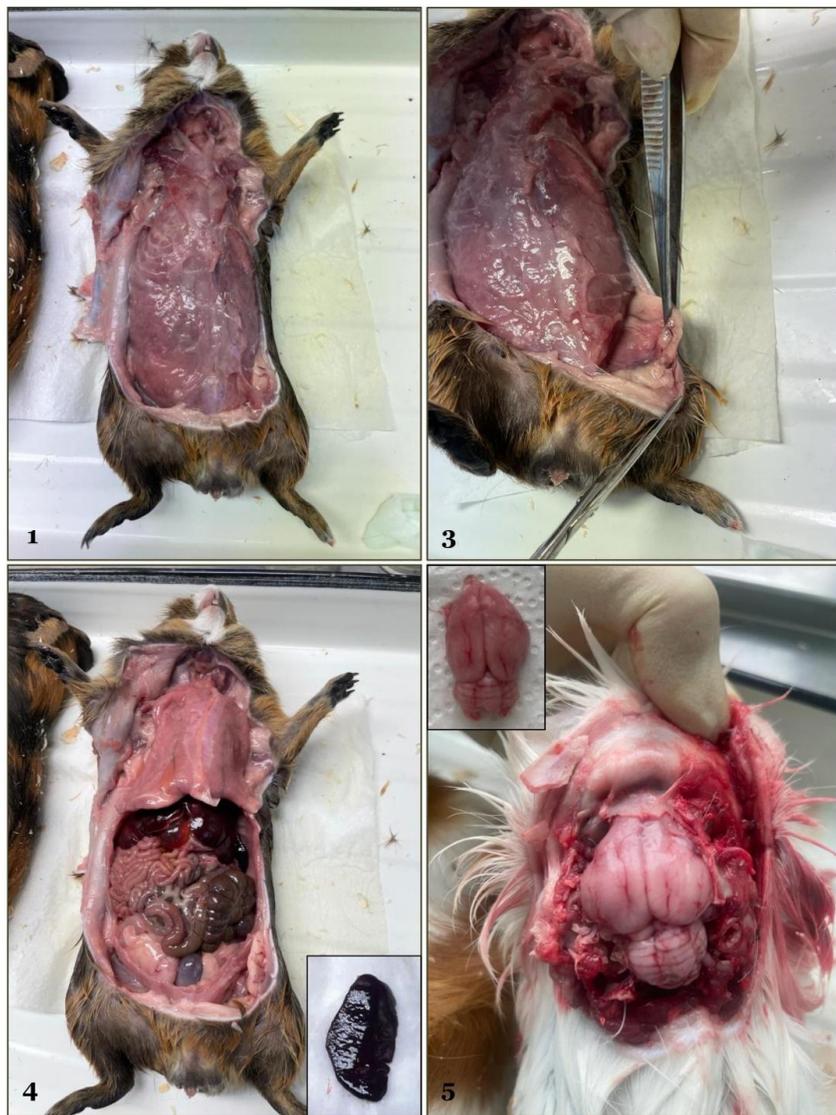


Рис. 22.5. Патологоанатомическая картина у морской свинки. Можно видеть отсутствие студенистого геморрагического отёка подкожной клетчатки, равно как и изменений в органах, включая головной мозг (изъятые селезёнка и головной мозг представлены в отдельных рамках)



Рис. 22.6. Патологоанатомическая картина у хомячков, выраженная характерным «вздутием»

этот момент нелишним будет задержаться и *подумать о безмолвном подвиге отважного животного, поскольку оно только что отдало свою жизнь ради спасения человечества.*

Окраску мазков-отпечатков проводят с целью визуализации капсулы, обычно по М'Фаддену или Ребигеру, но также можно окрашивать *способом Лю*^{1, <2>}. Для этого на фиксированный мазок-отпечаток на 30–45 секунд наносят раствор LiuA, состоящий из смеси эозина и метанола, после чего на 90–120 минут наносят двойной объём раствора LiuB, состоящий из азура и метиленового синего, и аккуратно перемешивают путём выдувания воздуха из спринцовки. Излишки красителя осторожно смывают. В результате окрашивания бактериальные клетки окрашиваются в фиолетовый цвет, а капсула остаётся прозрачной с тонким фиолетовым ореолом на границе капсульного вещества (Рис. 22.7).

¹ Предложена тайваньским гематологом Лю Хуэй (劉禎輝, 1921–2001). Иногда именуется окраской по Рю из-за японского прочтения фамилии.

² 劉禎輝：血液塗抹標本之一 新迅速染色法，第一報。臺灣醫學會雜誌，1953；52(6):348-352.

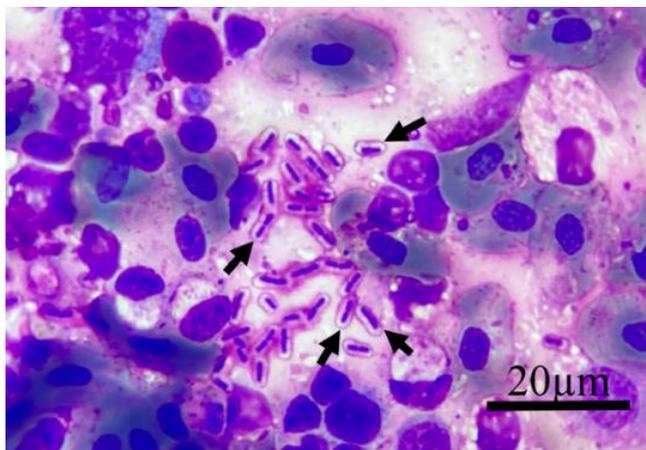


Рис. 22.7. Мазок-отпечаток селезёнки китайского трикинса, на котором видно капсулу (стрелки) штамма *V. tropicus* JMT; окраска по Лю (по Tsai J.-M., 2023)

В окрашенных мазках сибиреязвенный микроб, как правило, располагается короткими цепочками, попарно или поодиночке. На чашках, инкубированных сутки, ищут колонии, характерные для сибиреязвенного микроба (как описано в Главе 21). В том случае, если чистая культура возбудителя получена из нативного материала раньше, чем пало животное, заражённое этим материалом, не дожидаясь его гибели, заражают ещё двух животных этой культурой, сутки инкубированной в бульоне.

Для ускоренного обнаружения способности к капсулообразованию заражают животное внутрибрюшинно, для чего его фиксируют и удерживают в вертикальном положении (головой вниз), чтобы органы брюшной полости сместились к диафрагме. Обработав кожу тампоном, смоченным физиологическим раствором, зашпигивают пинцетом кожу животного в правой нижней стороне брюшка, отступая примерно 0,5–0,8 см от белой линии живота, и несколько оттягивают (приподнимают вверх) до образования треугольной складки. Шприц с материалом удерживают горизонтально и, не меняя положения, вводят иглу в основание складки, при это ощущая прокол кожи и брюшины (ощущение провала иглы в пустоту). Далее надавливают на поршень шприца, вводя 0,5 мл подготовленного материала, после чего пинцетом берут тампон, накрывают место инъекции и вытаскивают иглу из кожи. В случае хомячков, ввиду их вёрткости, необходимо фиксировать все лапы,

из-за чего зашпинуть кожную складку пинцетом не представляется возможным. В этом случае у удерживаемого в вертикальном положении (головой вниз) животного оттягивают задние лапки и немного разводят в стороны, после чего вводят иглу шприца под углом 45° и надавливают на поршень шприца, вводя содержимое (Рис. 22.2-b). Спустя один или два часа после инъекции вскрывают животное и делают мазки-отпечатки экссудата брюшной полости, которые затем фиксируют и окрашивают (по М'Фадену и Ребигеру).

В исследовательской практике иногда необходимо смоделировать кишечную и лёгочную форму заболевания, для чего материал вводят в желудок и в лёгкие. В первом случае (чрезпищеводное заражение) животное фиксируют и удерживают в вертикальном положении (головой вверх). Далее через ротовую полость вводят металлический зонд, представляющий собой загнутую металлическую трубку с утолщением у края в виде оливы, соединённый со шприцем (Рис. 22.2-с). Аккуратно надавливая на поршень, добиваются полного попадания жидкости в желудок животного. В случае заражения морских свинок и кроликов целесообразно использовать роторасширитель. Заражение через дыхательные пути осуществляется интраназально, для чего животное фиксируют в положении лёжа и седатируют до появления состояния лёгкого наркоза (прикладывают к носу кусочек ваты, смоченный простым эфиром или хлороформом). Далее материал вводят в носовые проходы небольшими каплями с помощью шприца на глубину 1–1,5 мм мышам, 2–3 мм – хомячкам, 4 мм – морским свинкам и кроликам. Время наблюдения и вскрытия зависят от поставленных в эксперименте задач.

Кроме того, осуществляют и внутримышечное заражение, для чего фиксируют животное в горизонтальном положении (брюшком вниз), фиксируя лапы (в случае хомячков задние лапы немного отводят в стороны). Затем вводят иглу шприца под углом 90° и надавливают на поршень шприца, вводя содержимое (Рис. 22.2-d).

Для оценки вирулентности (*in vivo*) исследуемую культуру отсевают на специальные среды, способствующие спорообразованию (например, картофельный агар), и инкубируют сутки при 37°C , после чего инкубируют ещё 4–6 суток при 34°C , контролируя про-

цесс спорообразования окрашиванием мазков. При достижении 95–100 % спор культуру смывают с агара дистиллированной водой и полученную таким образом суспензию сохраняют при температуре 0–4 °С (холодильник) в течение 2–3 суток для лизиса оставшихся вегетативных клеток. Для определения концентрации спор готовят взвесь, содержащую 10^7 спор, сравнивая со стандартом мутности по МакФарланду¹ или с отраслевым стандартным образцом (ОСО), калиброванным в соответствии с Международным стандартом мутности образцов². Затем титруют для определения реального количества спор в суспензии, способных к прорастанию (жизнеспособных спор) так называемым *чашечным методом*. Готовят 9 пробирок, содержащих по 4,5 мл 0,1–0,05%-ного раствора Твин-80 на дистиллированной воде. В первую пробирку вносят 0,5 мл споровой взвеси и тщательно перемешивают³, получая *минус первое разведение* (10^{-1}) или концентрацию спор 10^8 . Затем из этой пробирки переносят 0,5 мл во вторую пробирку и тщательно перемешивают, получая *минус второе разведение* (10^{-2}) или концентрацию спор 10^7 . Повторяют процедуру до получения разведений 10^{-6} и 10^{-7} , из которых по 0,1 мл высевают на 6 чашек с агаром Хоттингера (по три чашки на каждое разведение), которые инкубируют сутки при 37 °С. На следующий день подсчитывают выросшие колонии и по среднему значению рассчитывают концентрацию спор в исходной смеси исходя из того, что *одна выросшая колония на чашке произошла из одной живой споры*. Подсчёт осуществляют по формуле:

¹ Предложен американским врачом, бактериологом Джозефом МакФарландом (Joseph McFarland; 1868–1945) и изготавливается путём смешения 1%-ного раствора серной кислоты с 1,175%-ным раствором дигидрата хлорида бария, в результате чего образуется сульфат бария (см. McFarland J. *The nephelometer: an instrument for estimating the numbers of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and vaccines*. J Am Med Assoc. 1907; 49:1176–1178).

² Представляет собой взвешенные в дистиллированной воде частицы боросиликатного стекла (Рухек®) диаметром 0,5–3,5 мкм. Стандарты выпускаются плотностью 5 МЕ и 10 МЕ, что для сибирезвенных спор соответствует $5,5 \times 10^4$ м. к./мл (т. е. микробных клеток в миллилитре) и $0,11 \times 10^9$ м. к./мл, соответственно (см. *5th International reference preparation of opacity*, WHO International Standard, NIBSC code 76/522, Version 6.0 (2013), 2 p.).

³ Перемешивание осуществляют при помощи пипетки или дозатора путём засасывания и спуска жидкости для её перемещения внутри пробирки. **Не забывайте**, что для дальнейшего переноса жидкости в следующую пробирку необходимо сменить пипетку (наконечник дозатора)!

$$C = \frac{N_1}{c_1 \cdot d_1} + \frac{N_2}{c_2 \cdot d_2} = \frac{\sum N}{(c_1 + 0,1 \cdot c_2) \cdot d_1}, [\text{спор/мл}],$$

где N – количество колоний на чашке; c_1 и c_2 – количество чашек исследуемых разведений; d – коэффициенты разведений.

Подставив значения разведений и количества чашек, получим:

$$\frac{\sum N}{3,3 \cdot 10^{-6}}.$$

Определив реальное количество спор в суспензии, приготавливают титрованием соответствующие разведения на физиологическом растворе по описанной методике. Взвеси, содержащие 1, 10, 100, 1000 и 10 000 спор, вводят подкожно по 0,5 мл четырёх-шести животным (на каждую концентрацию). Наблюдение осуществляют 10 суток, учитывая количество павших животных в каждой группе. Затем оценивают 50%-ную летальность (LD_{50}) по методу Ридда и Мэнча. Для этого подсчитывают летальность, то есть отношение павших животных к выжившим (в процентах) в каждом разведении. Разведение, где летальность ниже 50 %, но максимально приближена к этому значению, именуется *нижней критической зоной*, а разведение, где летальность выше 50 %, но максимально приближена к этому значению, – *высшей критической зоной*. Например, для результатов, представленных в Табл. 22.1, видно, что ближайшими к 50 % будут разведения 10^{-4} и 10^{-5} , поскольку летальность при этих разведениях соответственно равна 66,7 и 33,4. Соответственно, разведение 10^{-4} будет являться высшей критической зоной, а разведение 10^{-5} – нижней.

Далее, для определения LD_{50} пользуемся формулой:

$$\lg LD_{10} = \lg BKЗ - \frac{L_{BKЗ-50}}{L_{BKЗ} - L_{HKЗ}} \lg k,$$

где $BKЗ$ – разведение высшей критической зоны; $L_{BKЗ}$ – летальность высшей критической зоны, %; $L_{HKЗ}$ – летальность нижней критической зоны, %; k – коэффициент разведения.

Подставив значения нашего случая (поскольку разведения десятикратные, то коэффициент будет равен 10), получим: $\lg 10^{-4} - \frac{66,7-50}{66,7-33,4} \lg 10 = -4 - \frac{16,7}{33,3} \cdot 1 = -4 - 0,5 = -4,5$. Таким образом, разведение, 0,5 мл которого способно вызвать гибель 50 % заражённых животных, равно $10^{-4,5}$.

Табл. 22.1. Пример данных при определении вирулентности *in vivo*

Разведения	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
Количество павших животных (из 6)	6	6	5	4	2	0
Летальность, %	100	100	83,4	66,7	33,4	0

Оценивают безусловную смертельную дозу (DCL). Для этого взвеси, содержащие 100, 1000 и 10000 спор, вводят подкожно по 0,5 мл минимум трём животным (на каждую концентрацию). Наблюдение осуществляют 10 суток, исследуя органы павших животных (мазки-отпечатки и посевы).

Культура сибиреязвенного микроба признаётся вирулентной, если значения LD₅₀ или DCL не превышают 10000 спор¹.

23

РЕАКЦИЯ «АНТИГЕН – АНТИТЕЛО»

Специфичность взаимодействия антигена с антителом долгое время оставалась единственным инструментом, позволяющим надёжно и быстро выявить возбудитель, а также оценить ход протекания инфекционного процесса и оценить напряжённость иммунитета у переболевших и иммунизированных. В последнем случае ставят кожно-аллергическую пробу с антраксином (гидролизатом вегетативных клеток *B. anthracis*), который вводят строго внутри-

¹ Считается, что для белых мышей LD₅₀ до 10 спор соответствует высоковирулентному штамму, 11–20 спор – вирулентному, 21–200 спор – умеренно вирулентному, 201–10⁴ – слабо вирулентному, а свыше этого – авирулентному. Однако надо помнить о неоднородности чувствительности различных линий мышей. Так, линии DBA/2J и A/J являются чувствительными, тогда как линии CBA/J, BALB/cJ и C57BR/cdJ – устойчивые.

можно по 0,1 мл в область нижней трети внутренней стороны левого предплечья. В результате должна образоваться беловатая папула около 0,8 мм с чёткими границами. Далее, за счёт контакта введённого аллергена с IgE на поверхности базофилов происходит активация последних, приводящая в результате каскада ферментных реакций к дегрануляции и высвобождению медиаторов из гранул (гепарин, гистамин), то есть аллергической реакции в виде гиперемии и инфильтрации кожи спустя 8–12 часов у заболевших (переболевших и вакцинированных). Оценку результатов проводят по системе четырёх крестов:

		24 часа	48 часов
4+	++++	гиперемия более 40 мм, инфильтрат присутствует	гиперемия более 8 мм
3+	+++	гиперемия 26–40 мм, инфильтрат присутствует	гиперемия более 8 мм
2+	++	гиперемия 16–25 мм, инфильтрат присутствует	гиперемия более 8 мм
1+	+	гиперемия 8–15 мм, инфильтрат присутствует	гиперемия более 8 мм
	±	гиперемия до 8 мм, инфильтрат присутствует	незначительная гиперемия
	–	инфильтрат отсутствует, гиперемия возможна	реакции нет

Диагноз у контактных и наличие иммунитета подтверждается при наличии положительной реакции (от 2+ до 4+). Слабоположительная (1+) и сомнительная (±) реакции требуют повторной постановки пробы спустя 5–7 дней. Отрицательная реакция не исключает риска заражения, как и не свидетельствует об отсутствии иммунитета, поскольку положительная реакция наблюдается лишь у 82 % больных с острой формой заболевания и у 61 % вакцинированных.

Пробу с антраксином также ставят животным, для чего препарат вводят строго внутривенно по 0,2 мл в область средней части

наружной поверхности уха. В результате должна образоваться папула с чёткими границами, исчезающая через 15–20 минут. Оценку результатов проводят через 6–24 часа по системе крестов:

- + наличие инфильтрата и гиперемии больше 10 мм, утолщение кожной складки на 3 мм и больше
- ± наличие инфильтрата до 10 мм и слабой гиперемии (может отсутствовать), утолщение кожной складки до 3 мм
- отсутствие инфильтрата и гиперемии, утолщение кожной складки не более чем на 2 мм

При наличии положительной (+) реакции животное подлежит изоляции. Сомнительная (±) реакция требует повторной постановки пробы в другое ухо спустя сутки. Если при повторной постановке результат оказывается сомнительным или положительным, животное подлежит изоляции. При отрицательной реакции животное признают здоровым.

В качестве аналога данной реакции *in vitro* предлагается^{<1>} использовать тест на активацию базофилов методом проточной цитофлуориметрии, в котором в пробирки с испытуемой кровью добавляют антраксин и окрашивают смесью моноклональных тел к CD63 человека, конъюгированных с флюоресцирующей меткой. В результате в крови больных кожной формой сибирской язвы обнаруживается от 41 до 79 % активированных базофилов, а у вакцинированных – от 12 до 26 %.

В 1911 году Альберто Асколи² разработал^{<3>} метод, позволяющий обнаружить антигены сибиреязвенного микроба в экстрактах из клинического материала (струпьев язв больных), органов умерших людей и животных, объектов окружающей среды (шкур), включая загнивший биоматериал. Для постановки реакции, именуемой сейчас *преципитация по Асколи*, свежий биоматериал вы-

¹ Куличенко А. Н., Ракитина Е. Л., и др. *Использование теста активации базофилов с антраксином для лабораторной (in vitro) диагностики сибирской язвы*. Проблемы особо опасных инфекций. 2012; 3(113):86–88; DOI: 10.21055/0370–1069–2012–3–86–88.

² Alberto Ascoli; 1877–1957; итальянский химик, гигиенист.

³ Ascoli A. *Die Präzipitindiagnose bei Milzbrand*. Centralbl Bakt Parasit Infect. 1911; 58:63–70.

держивают в течение 18–20 часов при 37 °С и измельчают. Далее его заливают смесью из физиологического раствора и 0,3%-ного фенола в соотношении 1 : 10, после чего оставляют отстаиваться при комнатной температуре на 16–18 часов (*холодная экстракция*), либо кипятят в течение получаса (*горячая экстракция*). Важно понимать, что во втором случае часть преципитинов разрушается, поэтому имеется риск получения ложноотрицательных результатов, особенно учитывая, что в случае выделанных шкур на результаты реакции могут также повлиять кислоты и щёлочи, используемые для их выделки (оптимальное значение рН для постановки реакции должно находиться в пределах от 6 до 8).

Полученные экстракты фильтруют через предварительно смоченные физиологическим раствором фильтровальную бумагу или вату. Затем в узкие пробирки наливают по 0,2–0,3 мл прозрачной сибиреязвенной сыворотки, поверх которой осторожно настилают равное количество фильтрованного экстракта (лучше всего приливать экстракт по стенке, не допуская смешения с сывороткой). На границе между сывороткой и экстрактом в течение 15 минут должно появиться мутно-белое кольцо преципитации, свидетельствующее о присутствии в исследуемом материале искомого антигена (т. е. сибиреязвенного микроба). Поэтому этим же способом можно исследовать культуры. Для этого одну петлю суточной культуры ресуспендируют в 0,25–0,5 мл физиологического раствора и подвергают горячей экстракции, а учёт результатов проводят в течение 3 минут.

Позднее на основе данного метода была разработана *реакция диффузной преципитации по Оухтерлони*¹, суть которой заключается в «переносе» реакции по Асколи на поверхность агара. В частности, на чашку выливают тонким слоем 1,5%-ный агарозный гель, из которого после затвердевания осторожно вырезают лунки, в которые помещают исследуемую пробу и антитело (антиген) в зависимости от того, на что исследуют пробу. В результате помещённые в лунки антиген и антитело диффундируют друг к другу, взаимодействуют и между лунками образуется тонкая полоска преципитата. Таким образом можно исследовать пробы на присутствие токсинов

¹ Ouchterlony Ö. *Antigen – antibody reactions in gel*. Acta Pathol Microbiol Scand. 1949; 26(4):507–515; DOI: 10.1111/j.1699-0463.1949.tb00751.x.

сибиреязвенного микроба и даже обнаруживать антитела в крови больных.

Обнаружить возбудитель в крови можно также с помощью *иммуноферментного анализа* (ИФА; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay), в частности *непрямого неконкурентного гетерогенного ИФА* или «сэндвича». Суть этого метода заключается в том, что на твёрдый носитель (чаще всего дно лунки планшета) с иммобилизованными (т. е. прикреплёнными) антителами (Ат) к искомому антигену добавляют исследуемую пробу, потенциально содержащую антиген. Если проба его содержит, то при инкубации антигены (Аг) из пробы связываются с антителами, а непрореагировавшие компоненты реакции удаляются отмывочным раствором. Далее вносится конъюгат, представляющий собой специфические антитела (Ат*), меченные ферментом и способные связаться с антигеном (Аг). Непрореагировавшие компоненты снова удаляются промывкой. В итоге антиген из пробы оказывается как бы зажат между иммобилизованными антителами и конъюгатом, образуя «сэндвич»: **Ат – Аг – Ат***.

Поскольку в качестве конъюгата используются моноклональные антитела, меченные пероксидазой хрена (или другой коммерческой пероксидазой), для визуализации «сэндвича» используют субстрат-индикаторный раствор, состоящий из перекиси водорода и вещества, окисляющегося при взаимодействии с пероксидазой и перекисью водорода, что приводит к окрашиванию раствора, которое оценивается визуально и фотометрически. В частности, при использовании 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМВ) раствор окрасится в синий цвет (длина волны 370–650 нм). Для остановки реакции используют серную или ортофосфорную кислоту.

Чаще всего с помощью «сэндвича» обнаруживают протективный антиген. Чувствительность такой тест-системы составляет примерно 0,001 мкг/мл. Предлагается также использовать метод для обнаружения летального фактора (в этом случае на твёрдом носителе иммобилизован фрагмент протективного антигена)¹.

¹ Mabry R., Brasky K., et al. *Detection of Anthrax toxin in the serum of animals infected with Bacillus anthracis by using engineered immunoassays*. Clin Vaccine Immunol. 2006; 13(6):671–677; DOI: 10.1128/CVI.00023–06.

Для обнаружения антител используют *непрямой неконкурентный ИФА*, который в целом похож на «сэндвич», за тем исключением, что на твёрдом носителе иммобилизован антиген, ввиду чего схема приобретает следующий вид: **Аг – Ат – Ат***. Чаще всего с помощью этого метода обнаруживают антитела к капсуле сибиреязвенного микроба, что позволяет отличить инфекционный процесс от «последствий» вакцинации (напомним, что вакцинные штаммы не синтезируют капсулу). Однако сообщается^{<1>}, что антитела к капсуле могут быть обнаружены в результате воздействия иных представителей рода *Bacillus*. И даже обнаружение антител только к белку капсулы CapA (на твёрдом носителе иммобилизован фрагмент белка, названный CapA322)^{<2>} не позволяет исключить ложноположительных результатов с атипичными *B. cereus* ss и *Vcbva*.

В качестве более дешёвой альтернативы применяют *точечный твёрдофазный иммуноферментный анализ* или *дот-ИФА* (ДИА, dot-ELISA), в котором в качестве твёрдого носителя используют нитроцеллюлозную подложку с нанесённым на неё в виде точек антителом (антигеном), помеченным цветной меткой. В результате реакции образуются цветные пятна, легко различимые на белом фоне, что исключает необходимость использования фотометра. Существующие дот-ИФА позволяют обнаружить протективный антиген^{<3>}.

Сыворотку инфицированного человека (подозрительного на инфицирование) можно исследовать методом флуоресцирующих антител (о нём мы уже говорили в Главе 21). Для этого готовят фиксированные мазки из суточной культуры вакцинного штамма (допускается хранение в холодильнике в течение 3 суток), на которые наносят сыворотку, предварительно инактивированную добавлением мертиолята натрия (1:10000) и инкубируемую на водяной бане в течение 20 минут (в качестве контроля используют сыворотку

¹ Harrison L. H., Ezzell J. W., et al. *Evaluation of serologic tests for diagnosis of anthrax after an outbreak of cutaneous anthrax in Paraguay*. J Infect Dis. 1989; 160(4):706–710; DOI: 10.1093/infdis/160.4.706.

² Zorig T., Furuta Y., et al. *Development of ELISA based on Bacillus anthracis capsule biosynthesis protein CapA for naturally acquired antibodies against anthrax*. PLoS One. 2021; 16(10):e0258317; DOI: 10.1371/journal.pone.0258317.

³ Sastry K.S.R., Tuteja U., et al. *Identification of Bacillus anthracis by a simple protective antigen-specific mAb dot-ELISA*. J Med Microbiol. 2003; 52(Pt 1):47–49; DOI: 10.1099/jmm.0.05027–0.

крови здорового человека). Стёкла помещают на дно чашки Петри, закрывают крышкой и выдерживают 20–30 минут при 37 °С, после чего промывают (по 10 минут) двукратно физиологическим раствором и однократно дистиллированной водой. После высыхания на мазки наносят сыворотку (сибиреязвенные люминесцирующие иммуноглобулины против иммуноглобулинов человека) и помещают в чашку Петри с комочком влажной ваты (так называемая влажная камера), выдерживая 20 минут при 37 °С. Затем дважды тщательно промывают физиологическим раствором (по 10 минут), дистиллированной водой и высушивают. Исследуют под иммерсионным маслом, как описано в Главе 21.

Реакция непрямой (РНГА) или пассивной (РПГА) гемагглютинации также используется для обнаружения антител к протективному антигену сибиреязвенного микроба в сыворотке крови, в частности, для определения антител в крови вакцинированных людей и животных. В данном случае реакция основана на способности специфического склеивания (гемагглютинации) эритроцитов, sensibilizированных (нагруженных) специфическим антигеном, с материалом, содержащим антитело. При этом результат реакции наблюдается в виде выпадения на дно лунки планшета склеенных эритроцитов.

Для постановки реакции в минимум восемь лунок U-образного планшета вносят по 200 мкл физиологического раствора, после чего в первую лунку вносят 200 мкл исследуемой сыворотки крови и титруют до седьмой лунки. Затем во все лунки вносят по 50 мкл сибиреязвенного антигенного эритроцитарного диагностикума (восьмая лунка без пробы – контроль самоагглютинации сыворотки). Затем планшет аккуратно встряхивают (шуттелируют) для смешения компонентов и выдерживают 1,5–2 часа при комнатной температуре (от +10 до +20 °С). Схема метода приведена в **Табл. 23.1**. Постановка считается валидной, если в контроле (восьмой лунке) отсутствует гемагглютинация, то есть видны маленькие колечки или пуговки на дне лунки. При отрицательном результате гемагглютинация отсутствует (как в восьмой лунке), а при положительном – эритроциты располагаются на дне равномерным слоем (зонтики). Учёт положительного результата также рассматривают в системе четырёх крестов:

- ++++ эритроциты ровным слоем покрывают всё дно лунки (зонтик)
- +++ картина зонтика с загибающимися краями
- ++ картина зонтика со слабо выраженным кольцом по краю
- + выраженное кольцо эритроцитов на фоне слабовыраженной картины зонтика

Результаты РНГА считают положительными, если положительный результат (не менее +++) обнаруживается в лунках, начиная с разведения 1:8 и выше.

Если набор включает дополнительные контроли (негативную и позитивную сыворотки), то во время постановки в отдельных лунках повторяют манипуляции: физиологический раствор – сыворотка (титрование) – диагностикум – инкубация. Далее оценивают результат, где в случае негативной сыворотки гемагглютинация должна отсутствовать, а в случае позитивной – присутствовать в лунках с титром не ниже 1:64.

Табл. 23.1. Схема постановки РНГА-Ат

Номер лунки Реагенты	1	2	3	...	7	Контроль диагностикума
Разводящая жидкость (физиологический раствор), мкл	200	200	200	...	200	200
Исследуемый материал (сыворотка), мкл	200 ²⁰⁰ →	200 ²⁰⁰ →	200 ²⁰⁰ →	...	200 ²⁰⁰ ↑	X
Сибирезвенный антигенный эритроцитарный диагностикум, мкл	50	50	50	...	50	500
Инкубация при комнатной температуре (1,5–2 часа)						
Итоговое разведение сыворотки	1:1	1:2	1:4	...	1:64	

Похожим образом проводят реакцию латексной агглютинации для идентификации сибиреязвенной капсулы или спор, в которой вместо эритроцитов используются полистироловые или полиакролеиновые латексные частицы размером 1,2–1,8 мкм, нагруженные соответствующими антителами. Замена эритроцитов на латексные частицы позволяет значительно повысить устойчивость диагностикума. Чувствительность такой тест-системы в случае капсулы составляет примерно 0,001 мкг/мл (как при ИФА), а в случае спор – 2×10^6 спор/мл.

Вместе с тем самым простым и быстрым до настоящего дня остаётся иммунохроматографический анализ (ИХА, LFT, от англ. lateral flow test), суть которого состоит всё в той же реакции «антиген – антитело», осуществляемой путём миграции исследуемой жидкости по тест-полоске. Как и в случае латексной агглютинации, с помощью ИХА можно обнаружить капсулу сибиреязвенного микроба и споры. В этом случае исследуемая проба (аналит), содержащая антиген (Аг), наносится на тест-полоску и связывается с конъюгатом (Аг*) – меченым антителом, как правило, коллоидным золотом. Далее, комплекс Аг – Аг* мигрирует по полоске, встречая первый барьер, состоящий из специфических антител к искомому антигену. Образуется «сэндвич»: Аг – Аг – Аг*. Избыток конъюгата (Аг*) движется дальше, встречая второй барьер, где связывается с антителами к этому конъюгату (Аг'). Образуется комплекс: Аг' – Аг*. В итоге, если в пробе содержался искомый антиген, цветные метки (Аг*) будут задержаны обоими барьерами, а если не содержался – только вторым барьером. Визуально это будет идентифицироваться как одна или две полоски, как правило, отмеченные буквами «Т» (тест) и «К» (контроль). Соответственно, любой результат, где отсутствует полоска контроля, считается невалидным. Интересной модификацией способа является ИХА на основе латексной полоски, позволяющей идентифицировать капсулу сибиреязвенного микроба¹ и споры².

¹ Gates-Hollingsworth M. A., Kolton C. B., et al. *Rapid capsular antigen immunoassay for diagnosis of inhalational Anthrax: preclinical studies and evaluation in a nonhuman primate model*. mBio. 2022; 13(3):e00931–22; DOI: 10.1128/mbio.00931–22.

² Кравец Е. В., Дугаржапова З. Ф., и др. *Применение методов латекс-агглютинации и иммунохроматографии для ускоренной идентификации культур *Bacillus anthracis* при эпидемиологических расследованиях*

Исследование выделенной культуры на чувствительность к антимикробным препаратам (антибиотикочувствительность) является важным этапом лабораторной диагностики сибирской язвы. Как и в случае возбудителей иных особо опасных инфекций, оценку проводят с помощью *диско-диффузионного метода* (disk diffusion test), также именуемого *методом Кирби – Бауэра* (Kirby-Bauer test), или *метода серийных разведений*.

Суть первого метода заключается в нанесении дисков с антибиотиками на агар, куда предварительно была засеяна тестируемая культура «сплошным газоном». Для этого предварительно автоклавированный и остуженный до 48–50 °С питательный агар разливают по 25 мл в чашки Петри диаметром 100 мм или по 20 мл в чашки диаметром 90 мм, чтобы толщина агара составляла примерно 4 мм, после чего оставляют для застывания при комнатной температуре. После высушивания чашки рекомендуется использовать немедленно или в течение суток при условии хранения при 4–8 °С. Непосредственно перед работой их подсушивают в течение 15 минут при 37 °С, чтобы избежать образования конденсата. В качестве среды чаще всего используют агар Мюллера – Хинтона (Mueller – Hinton agar), принятый в качестве «золотого стандарта», а также агар Хоттингера (рН 7,0–7,4) и агар Гивенталья – Ведьминой (рН 7,2–7,6).

Диски с антибиотиками используются коммерческого производства и хранятся при минус 18 °С (используемые в работе обычно хранят при 4–8 °С). За час до работы флаконы с дисками вытаскивают из холодильника, чтобы не допустить попадания влаги из-за резкой смены температур во время открытия. Суспензию из суточной культуры сибиреязвенного микроба (подозрительных колоний) в физиологическом растворе (2×10^7 м. к./мл) по 0,3 мл наносят на агар и равномерно распределяют шпателем. Через 10–15 минут,

когда агар подсохнет, с помощью пинцета¹ или автоматического диспенсера накладывают диски с антибиотиками на расстоянии не менее 15–20 мм между дисками и краями чашки (обычно не более 6 дисков на чашку диаметром 100 мм), слегка придавливая диски к агару. Чашку с дисками, а также засеянную чашку без дисков (контроль роста культуры) выдерживают при комнатной температуре 15 минут, после чего инкубируют (дном вверх) при 37 °С не более 18–20 часов.

Учёт результатов осуществляют путём измерения диаметра зон ингибирования роста бактерий (просветления в «сплошном газоне») и сравнения их с пограничными значениями, приведёнными в Табл. 24.1. Для этого чашки помещают на тёмную поверхность вверх дном, направляя луч света под углом 45°. При наличии зон с расплывчатыми краями или двойными контурами диаметр измеряют по наиболее чёткой границе.

Изучив таблицу, Вы, вероятно, несколько удивлены присутствию в ней цефалоспоринов I поколения, в частности, цефазолина и цефалексина, поскольку при обсуждении антибиотикотерапии они не упоминались (Глава 18). Действительно, хотя в отличие от цефалоспоринов II и III поколений к этим препаратам сибиреязвенный микроб чувствителен, и когда-то они использовались в лечении, последние исследования² показывают их эффективность только для постконтактной терапии и на ранних стадиях заболевания. Тем не менее культуры на чувствительность к ним исследуются, но исключительно на тот случай, если к остальным препаратам окажутся устойчивы (что, честно говоря, маловероятно). Аналогичным образом обстоят дела с канамицином, линкомицином и ломефлоксацином.

Следует добавить, что перед использованием новой партии диски проверяют с помощью референс-штаммов³ (Табл. 24.2) на среде

¹ После нанесения каждого диска его следует несколько утопить в среде, а пинцет – фламбировать, чтобы не допустить вынос культуры из чашки.

² Sittner A., Bar-David E., et al. *Closing the gaps: testing the efficacy of carbapenem and cephalosporin treatments of late-stage Anthrax in rabbits*. Pathogens. 2024; 13(11):936; DOI: 10.3390/pathogens13110936.

³ В качестве референс-штаммов (тест-штаммов) используют типичные штаммы с хорошо изученными свойствами, отличающиеся генетической стабильностью. В случае определения чувствительности к антибиотикам используют вакцинный

Мюллера – Хинтон, поскольку диски, дающие меньшие или большие диаметры зон ингибирования, чем это установлено для референс-штаммов, подлежат выбраковыванию (их использование может привести к получению невалидных результатов). Особенно опасна ситуация, когда бракованный диск даёт большую зону ингибиции, поскольку в этой ситуации имеется риск отнесения резистентного штамма к чувствительному.

Метод серийных разведений позволяет определить минимальную подавляющую концентрацию (МПК) антибиотика за счёт внесения его известного количества в питательную среду, чаще всего твёрдую (агар Мюллера – Хинтон, агар Гивенталя – Вёдьминой). Важным этапом для данного метода является приготовление основного раствора антибиотика, пригодного для хранения, и рабочего, который сразу будет использован для приготовления питательных сред. При этом допустимо использовать как жидкие, так и твёрдые питательные среды, но на практике применяют только твёрдые.

Для основного раствора используют субстанции с известной активностью (в экстренной ситуации допустимо использовать препараты, предназначенные для инъекций), которые взвешивают на аналитических весах с точностью до четвёртого знака и вносят в растворитель. Расчёт массы препарата (навески) осуществляют по формуле:

$$m_p = \frac{C \cdot V}{K_A}, [\text{мг}],$$

где C – необходимая концентрация препарата, мкг/мл; V – объём растворителя, мл; K_A – активность препарата (количество активного вещества, содержащееся в используемой субстанции), мкг/мл.

На практике взвесить точное расчётное количество вещества невозможно, поэтому по традиции аналитической химии готовят навеску, близкую к расчётной, и пересчитывают необходимый объём растворителя по формуле:

штамм *B. anthracis* (например, СТИ), а также для внутреннего контроля качества определения антибиотикограммы – штамм *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

$$V_{\text{п}} = \frac{m_{\text{п}} \cdot V_{\text{т}}}{m_{\text{р}}}, [\text{мл}],$$

где $m_{\text{п}}$ – практическая масса препарата (навески), мг; $m_{\text{р}}$ – расчётная масса препарата (навески), мг; $V_{\text{т}}$ – объём растворителя, взятый для растворения расчётной навески, мл.

Следует отметить, что для ряда антибиотиков растворителем будут являться два вещества: солюбилизатор и разбавитель (Табл. 24.3). В таком случае препарат растворяют в минимальном объёме солюбилизатора и разводят до необходимого объёма разбавителем.

Для приготовления рабочих растворов из основного путём титрования получают нужные концентрации, используя в качестве растворителя дистиллированную воду. Вместе с тем если используются препараты в фасованном виде (ампулы, флаконы, таблетки), то приготовить рабочие растворы можно следующим образом.

В случае *жидкой формы* препарат растворяют в известном объёме дистиллированной воды. Например, если имеется флакон, содержащий 5 г вещества, то растворением его в 5 мл дистиллированной воды получим раствор концентрацией 10 000 мкг/мл. Далее, путём титрования можно получить растворы концентрацией 10 000 мкг/мл, 1000 мкг/мл и так далее. В случае растворения в солюбилизаторе и разбавителе объём разделяют.

В случае *твёрдой формы* препарат размельчают до порошкообразного состояния и растворяют в известном объёме дистиллированной воды, учитывая поправочный коэффициент, равный отношению общей массы препарата к массе активного вещества. Например, если в таблетке массой 375 мг содержится 250 мг активного вещества, то поправочный коэффициент будет равен 1,5 (375 : 250). Тогда для приготовления раствора концентрацией 10 000 мкг/мл необходимо 15 мг порошка, полученного из таблетки, растворить в 1 мл дистиллированной воды.

Далее готовят чашки Петри с предварительно автоклавированным и остуженным до 48–50 °С питательным агаром, в который добавлены антибиотики, в двукратно увеличивающихся концен-

трациях. Для этого в стерильные флаконы наливают по 20 мл агара и добавляют в них необходимое количество рабочих растворов (Табл. 24.4), начиная с наименьшей концентрации, после чего тщательно перемешивают и выливают в чашку.

С другой стороны, к 18 мл агара можно прилить по 2 мл рабочего раствора антибиотика в заранее приготовленных серийных разведениях, тщательно перемешать и вылить в чашки Петри. Таким образом конечная концентрация препарата в агаре будет в 10 раз меньше, чем концентрация вносимых серийных разведений рабочего разведения.

После высушивания чашки рекомендуется использовать немедленно или в течение суток при условии хранения при 4–8 °С. Непосредственно перед работой их подсушивают в течение 15 минут при 37 °С, чтобы избежать образования конденсата. Суспензию из суточной культуры сибиреязвенного микроба (подозрительных колоний) в физиологическом растворе (2×10^7 м. к./мл) наносят по каплям лёгким касанием пипетки (примерно 0,005 мл) на поверхность агара, начиная с наименьшей концентрации. Таким образом можно изучить до 20–50 штаммов (в том числе включить контрольный штамм, МПК для которого известны). Затем, через 10–15 минут, когда агар подсохнет, чашки (в том числе чашку без антибиотика для контроля роста культуры) инкубируют (дном вверх) при 37 °С не более 18–20 часов. Учёт результатов осуществляют путём сравнения минимальной концентрации препарата, подавляющей рост возбудителя (т. е. МПК), с пограничными значениями, приведёнными в Табл. 24.1.

По итогам тестирования обоими методами исследуемый микроорганизм относят к одной из категорий категории:

- *чувствительный*, т. е. применение антибиотика в рекомендуемых дозах приведёт к подавлению роста и размножения штамма;
- *промежуточный*, т. е. применение антибиотика приведёт к подавлению роста и размножения штамма только при максимально допустимых дозах, при этом не исключается отбор вариантов возбудителя, для которых даже максимальные дозы окажутся неэффективными;

- *устойчивый*, т. е. применение антибиотика в рекомендуемых дозах не приведёт к подавлению роста и размножения штамма, и, следовательно, использование этого антибиотика для лечения недопустимо.

Важно помнить, что клинически ориентированные категории чувствительности и проверенная устойчивость к антибиотикам не всегда коррелируют. Поэтому, даже если есть улучшение на фоне назначенной терапии, через 2–3 суток необходим бактериологический контроль эффективности этиотропной терапии (посев, биопроба). Кроме того, увеличение МПК для исследуемых штаммов по сравнению с контрольным может указывать на тенденцию к нарастанию устойчивости их к антибактериальным препаратам, что требует изменения схемы лечения.

Табл. 24.3. Растворители для антибиотических препаратов

Препарат	Растворитель	
	солюбилизатор	разбавитель
Рифампицин	метиловый спирт	дистиллированная вода
Ампициллин	фосфатный буфер (0,1 моль/л; рН 8)	фосфатный буфер (0,1 моль/л; рН 6)
Офлоксацин	половина объёма дистиллированной воды и по каплям добавить раствор NaOH (0,1 моль/л) до растворения	дистиллированная вода
Остальные	дистиллированная вода	

Табл. 24.4. Концентрации антибиотических препаратов, добавляемых в питательный агар

Необходимая концентрация препарата в 1 мл агара, мкг/мл	Концентрация препарата в рабочем растворе, мкг/мл	Количество рабочего раствора, которое необходимо внести в 20 мл агара, мл
0,06	10	0,12
0,125		0,25
0,25		0,5
0,5	100	0,1
1		0,2
2		0,4
4		0,8
8	1000	0,16
16		0,32
32		0,64
64	10000	0,128
128		0,256
256		0,512

Примечание:

для приготовления растворов препаратов в концентрациях 1000 мкг/мл и 10000 мкг/мл применяют димексид или 26%-ный раствор этилового спирта.

Табл. 24.1. Допустимые диаметры зон подавления роста и значения МПК для исследуемой культуры

Препарат	Диско-диффузионный метод		Метод серийных разведений		
	Содержание в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста, мм	Значение МПК, мкг/мл		
		S	R	S	R
Азитромицин	30	≥ 24	≤ 16	≤ 1	≥ 4
Амикацин		≥ 23			
Ампициллин	10	≥ 27	≤ 16	≤ 0,1	≥ 1
Бензилпенициллин		≥ 26			
Гентамицин		≥ 23		≤ 1	≥ 4
Доксициклин				< 0,1	≥ 1
Имипенем	 	 	 	< 0,1	≥ 1
Канамицин	10	≥ 19	≤ 16	≤ 1	≥ 4
Линкомицин	15	≥ 23			
Ломефлоксацин	10	≥ 20	≤ 15	< 0,1	≥ 1
Меропенем		≥ 26			
Офлоксацин	5	≥ 19			
Пефлоксацин	10				
Рифампицин	5	≥ 20	≤ 13	≤ 0,1	
Стрептомицин	10	≥ 18	≤ 16	≤ 1	≥ 4
Тетрациклин	30	≥ 23		< 0,1	≥ 1
Цефазолин		≥ 29		≤ 0,2	
Цефалексин				≤ 1	≥ 4
Ципрофлоксацин	5	≥ 17	≤ 15	< 0,1	≥ 1
Эритромицин	15	≥ 24	≤ 16	≤ 1	≥ 4

Табл. 24.2. Допустимые диаметры зон подавления роста для контрольных штаммов

Препарат	Со-дер-жа-ние в дис-ке, мкг	Диаметр зон подавления роста, мм					
		Мюллера – Хинтон агар		Агар Хоттингера		Гивенталья – Ведыминой агар	
		<i>S. aur</i> <i>eus</i> ATCC 25923	<i>B. anthr</i> <i>acis</i>	<i>S. aur</i> <i>eus</i> ATCC 25923	<i>B. anthr</i> <i>acis</i>	<i>S. aur</i> <i>eus</i> ATCC 25923	<i>B. anthr</i> <i>acis</i>
Азитроми-цин	30	24–30				21–26	
Амикацин		20–26	26–32	20–26	26–32	20–26	
Ампициллин	10	27–35					27–32
Бензилпенициллин		26–37	32–39	26–37	34–40	26–30	32–39
Гентамицин		19–27	24–32	19–27	24–30	19–27	24–30
Доксициклин		23–29	30–40	23–29	30–40	23–29	27–32
Канамицин	30	19–26	22–30	19–26	22–30	19–26	19–26
Линкомицин	15	22–32		22–32		22–32	
Ломефлоксацин	10	23–29	27–35	23–29	27–35	23–29	22–30
Меропенем		29–37	30–37	29–37	30–37	27–35	
Офлоксацин	5	24–28	27–35	24–28	27–35	24–28	23–30
Пефлоксацин	10	17–28	27–35	17–28	27–35	17–28	22–30
Рифампицин	5	26–34	20–26	26–34	20–26	26–34	19–22
Стрептомицин	10	18–22	18–30	18–22	18–30	18–22	
Тетрациклин	30	24–30	30–40	24–30	30–40	24–30	30–35
Цефазолин		29–35	29–35	29–35	29–35	29–35	
Цефалексин		29–37		29–37	29–33		
Ципрофлоксацин	5	22–30	27–35	22–30	27–35	22–30	25–30
Эритромицин	15		18–24		18–24		18–24

Среди молекулярно-генетических методов наиболее популярным и распространённым в лабораторной практике является *полимеразная цепная реакция*, которая позволяет сравнительно быстро определить присутствие в пробе нуклеиновой кислоты искомого возбудителя. В нашем случае – ДНК *B. anthracis* (а также плазмид, но об этом чуть позже).

Отобранный материал (Глава 20), за исключением клинического материала, обрабатывают так же, как для бактериологического исследования (Глава 21), и отбирают по 0,1–0,2 мл водной фазы для дальнейшего исследования. Клинический материал специально не обрабатывают, но подготавливают для последующего выделения нуклеиновых кислот. Так, из кусочков органов и отделяемого язв с помощью предварительно фламбированных ножниц вырезают фрагменты массой 0,1–1 г (микроауштаты), которые помещают в фарфоровую ступку, куда прибавляют физиологический раствор в соотношении 1 : 10, после чего фрагменты аккуратно измельчают ножницами и растирают пестиком. Дают отстояться и отбирают по 0,1–0,2 мл надосадочной жидкости.

Далее, по 0,1 мл материала (если он потенциально содержит споры возбудителя) или одну петлю 18-часовой агаровой культуры сибиреязвенного микроба (подозрительных колоний) засевают в пробирки с 0,8 мл (для материала) или 0,9 мл (для культуры) бульона Хоттингера и инкубируют с аэрацией (т. е. с доступом воздуха) в течение 2,5 часов при 37 °С, обеспечивая таким образом *герминацию (прорастание) спор*. Затем добавляют пенициллин до конечной концентрации 100 ЕД/мл (для протопластирования клеток и облегчения лизиса)^{1,2} и инкубируют с аэрацией в течение 15 минут при 37 °С, после чего прогревают ещё 10–30 минут на твердотельном термостате или водяной бане при 100 °С.

¹ Обычно препарат фасуется во флаконы по 1 млн ЕД. Поэтому для получения нужной концентрации содержимое флакона растворяют в 100 мл дистиллированной воды, после чего 0,01 мл (10 мкл) добавляют в среду, доводя её чистой средой до 10 мл (можно изначально использовать 9,9 мл среды).

² В ряде руководств можно встретить концентрацию 1000 ЕД/мл.

Затем подготовленный на предыдущей стадии материал, а также материал, изначально свободный от спор, по 0,1 мл переносят в отдельные пробирки, куда приливают лизирующий раствор, приготовленный на основе 6М гуанидинтиоционата (0,3 мл), или раствор коммерческого производства, входящий в состав набора для выделения нуклеиновых кислот, после чего прогревают 15 минут при 60 °С.

С этого момента пробы считаются обеззараженными, и их передают на этап выделения нуклеиновых кислот и далее на ПЦР, в результате которой нарабатывается значительное количество фрагментов ДНК возбудителя, содержащих наиболее консервативные участки¹. Поиск именно этих участков до сих пор является одним из важных направлений исследований сибиреязвенного микроба. Почему? Вспомните Главу 4. Мы говорили, что из-за высокого хромосомного сродства с *B. cereus* ss, *B. thuringiensis* и иными сибиреязвенный микроб в последнее время часто уже рассматривают не как самостоятельный вид (подобно, например, чумному микробу), но как представителя *B. cereus* complex. Поэтому современные тест-системы ориентированы на поиск не только хромосомных маркеров, но и плазмидных, в качестве которых чаще всего выступают участки *pagA*, *lef*, *суа*, *capB* и *capA* (Рис. 25.1). Если уже успели забыть, какие участки на какой плазмиде расположены, перечитайте Главу 3.

Однако идентификация этих участков подтверждает только присутствие плазмид, их включающих. Например, идентификация участков *pagA* и *capC* может свидетельствовать о присутствии в пробе соответствующих плазмид как сибиреязвенного микроба, так и штаммов Vcbva. Особо придирчивые возразят, что случаев заражения человека штаммами Vcbva не было. В этом случае приведём другой пример: идентификация участка *pagA*, которая может указывать как на присутствие в пробе ДНК авирулентного (вакцинного) штамма *B. anthracis*, так и ДНК штамма *B. cereus* G9241, ответственного за сибиреязвенную пневмонию сварщиков, чаще всего имеющую фульминантное течение и заканчивающуюся летальным исходом. Конечно, все эти штаммы имеют иные культуральные

¹ Подробнее о ПЦР читайте в Главе 36 Оперы о чуме.

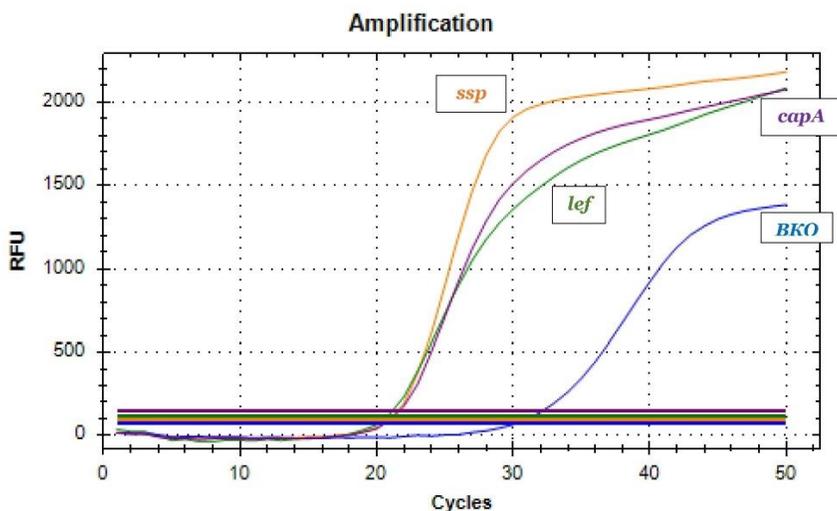


Рис. 25.1. График амплификации с зарегистрированными сигналами (кривыми по каналам детекции), соответствующими фрагменту хромосомной нуклеотидной последовательности *ssp*, фрагменту нуклеотидной последовательности *lef* плазмиды *rXO1* и фрагменту нуклеотидной последовательности *capA* плазмиды *rXO2*, а также внутреннему контролю образца (ВКО). Положительные контроли для наглядности опущены, горизонтальные линии – пороговая линия

свойства и «классическая» бактериология легко ответит на вопрос, чья же плазида, однако на практике смерть пациента наступает быстрее, чем идентификация культур на чашке. Говоря языком цифр, медицина проигрывает в 86 % случаев. И в этой связи следует отметить главное: во-первых, ПЦР является экспресс-тестом, позволяющим с определённой долей вероятности быстро заподозрить инфекцию, вызванную сибиреязвенным микробом или атипичным представителем *B. cereus complex*; во-вторых, важный вклад в правильную постановку диагноза вносит грамотная работа хорошего эпидемиолога; наконец, в-третьих, необходимо продолжать поиски генетических маркеров, уникальных для *B. anthracis*¹.

¹ В качестве мишеней недавно были предложены участки *BA_5358* и *BA_5361* хромосомного профага *lambda_Ba03* (см. Низкородова А. С., Мальцева Э. Р., и др. *Детекция *Vacillus anthracis* по генам профага *lambda_Ba03* посредством ПЦР в реальном времени*. Проблемы особо опасных инфекций. 2022; 3:170–172; DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-170-172).

В научных целях проводят анализ полиморфизма единичных нуклеотидов (SNP, single nucleotide polymorphism), при котором с помощью ПЦР оценивают вариабельность единичных нуклеотидов определённого локуса генома (так называемый *однонуклеотидный полиморфизм*), что позволяет, в частности, уточнять внутривидовую филогению. Вспомните, что именно на основе анализа 14 *canSNP* были определены три эволюционные линии для сибиреязвенного микроба (Глава 3).

Кроме того, изучают вариабельность так называемых *тандемных повторов* (tandem repeat), т. е. повторяющихся друг за другом участков ДНК. *Мультилокусное VNTR-типирование* (MLVA, от англ. multiple locus VNTR analysis) основано на изучении *тандемных повторов, отличающихся по числу повторов* (VNTR, от англ. variable number tandem repeat), а именно на ошибках, возникающих в процессе репликации VNTR. Для этого амплифицируют известные локусы с помощью ПЦР и сравнивают вариабельность VNTR с эталоном. В случае штаммов сибиреязвенного микроба, как правило, исследуют от 6 до 31 VNTR-локусов¹⁾. Данный метод применяется в качестве самостоятельного или в сочетании с SNP, позволяя создавать геномные портреты штаммов с целью дальнейшего проведения расследований вспышек или изучения географии распространения штаммов. В частности, исследование штаммов, выделенных во время вспышек, произошедших осенью 2006 года в Моздокском районе Республики Северная Осетия-Алания (Россия) и весной 2007 года в Курском районе Ставропольского края (Россия), показало их принадлежность к одному MLVA-генотипу и свидетельствовало о происхождении из одного неблагоприятного пункта²⁾. С другой стороны, исследование изолятов из Монголии³⁾ и Италии⁴⁾

¹ Например, исследуют шесть хромосомных (*vtgA*, *vtgB1*, *vtgB2*, *vtgC1*, *vtgC2*, *CG3*) и два плазмидных (*pXO1*, *pXO2*) локуса (см. Keim P., Price L. B., et al. *Multiple-Locus Variable-Number Tandem repeat analysis reveals genetic relationships within Bacillus anthracis*. J Bacteriol. 2000; 182:2928–2936; DOI: 10.1128/JB.182.10.2928–2936.2000).

² Рязанова А. Г., Еременко Е. И., и др. *Использование методов молекулярного типирования Bacillus anthracis в Референс-центре по мониторингу за возбудителем сибирской язвы*. Проблемы особо опасных инфекций. 2011; 4(110):68–70; DOI: 10.21055/0370–1069–2011–4(110)–68–70.

³ Okutani A., Tungalag H., et al. *Molecular epidemiological study of Bacillus anthracis isolated in Mongolia by multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for 8 loci (MLVA-8)*. Jpn J Infect Dis. 2011; 64(4):345–348.

позволило определить их генетические связи, способ проникновения и географию распространения.

⁴ Fasanella A., Van Ert M., et al. *Molecular diversity of Bacillus anthracis in Italy*. J Clin Microbiol. 2005; 43(7):3398–3401; DOI: 10.1128/JCM.43.7.3398–3401.2005.

Раздел III

Bacillus cereus

sensu stricto

1887 год. Супруги Фрэнклянд, Перси Фарадей¹ и Грейс Кольридж², занимаются выделением новых микроорганизмов из воздуха и воды. На одной из желатиновых пластин, оставленных в коровнике, они замечают образование большой колонии, в целом напоминающей рост открытого ранее *V. subtilis*, но «с той лишь разницей, что желатин разжижается быстрее». На агаре отличия были заметнее: колонии выросли влажные, серебристо-белые, гладкие, с воскообразным налётом. «Даже на очень старых культурах не наблюдается морщинистости, а лишь лёгкая зернистость поверхности». Однако и на желатине при очень тщательном рассмотрении заметны отличия. Так, при малом увеличении они «выглядят как круглые или овальные шерстяные массы с тонким шиповатым краем» (Рис. 26.1-3b), от которого при дальнейшем культивировании начинают отходить «длинные хлыстообразные и спирально закрученные нити» (Рис. 26.1-3c), впоследствии «приобретающие вид морской звезды, который легко виден невооружённым глазом».

«Мы установили с несомненностью, – продолжают супруги, – что все вышеперечисленные формы колоний происходят из одного и того же организма, поскольку мы неоднократно готовили чашки Петри путём инокуляции из отдельных колоний и снова получали колонии того же разнообразия по внешнему виду».

При капельном же выращивании в течение 12 часов наблюдается множество очень подвижных бацилл, в основном изолированных, но иногда образующих более длинные нити. Через 24 часа бациллы стали совершенно неподвижны, расположившись парами или нитями, по три-

¹ Percy Faraday Frankland, 1858–1946; британский химик, бактериолог. Член Королевского общества (1891). Президент Химического общества (1911–1913). Автор работ по стереохимии и выделению чистых культур микроорганизмов. Скончался спустя 23 дня после смерти жены.

² Grace Coleridge Frankland, 1858–1946; британский бактериолог-самоучка и борец за право женщин заниматься наукой. Автор работ по бактериологии, а также научно-популярной книги *Bacteria in Daily Life* («Бактерии в повседневной жизни»). В 1904 году стала одной из 19 женщин, подписавших петицию в Химическое общество, в которой обосновывалась необходимость принятия в общество женщин.



Перси Фарадей Франкланд и Грейс Кольридж Франкланд
(любезно предоставлено The John Rylands Research Institute and Library,
The University of Manchester)

четыре. Через 48 часов они всё ещё оставались неподвижными и наблюдалось обильное спорообразование, причём внутри каждого сегмента находилась блестящая овальная спора (Рис. 26.1-3а). Затем, по мере увеличения срока культивирования, нити постепенно распадались, а споры высвобождались...»

Так была открыта восковая бацилла или *Bacillus cereus sensu stricto*¹. Распространена она повсеместно, но основной экологической нишей является почва. Именно тут проводит *B. cereus ss* свои будни, правда, чаще всего в виде спор, герминация которых обычно происходит при наличии свободной органики, в качестве которой выступают растения, останки животных, содержимое желудочно-кишечного тракта пасущихся травоядных, а также содержимое кишечника некоторых червей, членистоногих и насекомых. И поскольку в отличие от сибиреязвенного микроба бактерия не спо-

¹ Frankland P. F., Frankland G. C. XI. *Studies on some new micro-organisms obtained from air*. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 1887; 178:257–287; DOI: 10.1098/rstb.1887.0011.

собна приводить к быстрому летальному исходу у животных, она может достаточно долго циркулировать между желудочно-кишечным трактом животного и землёй, контактируя в ней с различными химическими соединениями, например, тяжёлыми металлами. Снижая концентрацию последних, она влияет на рост растений, увеличение биомассы которых привлекает новых травоядных животных, что в процессе поедания будут заглатывать *B. cereus* ss, в результате чего он снова оказывается в кишечнике. Там после перехода в вегетативную форму возможен синтез церейна, подавляющего рост некоторых бактерий, в частности, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. и *Listeria monocytogenes*. Из-за этого свойства в животноводстве церейин-продуцирующие штаммы используют в качестве кормовой добавки, что в свою очередь способствует распространению *B. cereus* ss в окружающей среде.

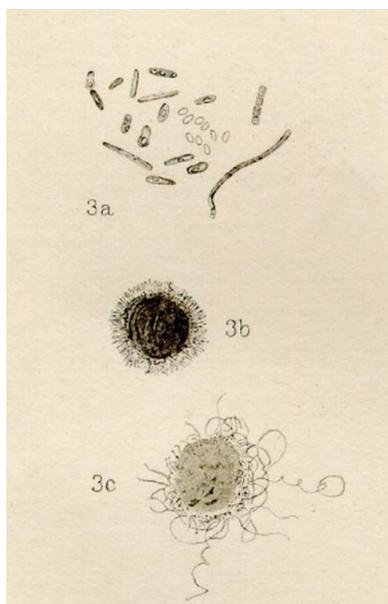


Рис. 26.1. Иллюстрации опытов супругов Франкланд, опубликованные или в статье (по Frankland G. C., 1887; публикуется по лицензии The Royal Society): 3а – споры *B. cereus* ss; 3б – колония *B. cereus* ss на желатиновой пластине в первые часы культивирования; 3с – колония *B. cereus* ss на желатиновой пластине спустя сутки культивирования

Снова попав в почву, бактерия либо формирует споры, либо «переселяется» в ризосферу растений, а также кишечник червей и членистоногих. Последнее наиболее интересно, поскольку пищеварительный тракт членистоногих устроен весьма просто: чаще всего это прямая трубка, в которую секретируются пищеварительные ферменты. И эта простота весьма удобна для *B. cereus* ss, который, колонизировав кишечник, получает все необходимые для жизни

питательные вещества. Исследования показывают^{<1>}, что бактерия закрепляется в кишечнике обыкновенных мокриц (*Porcellio scaber*) в 70 % случаев. Также поступают и её ближайшие родственники – *B. thuringiensis* и *M. mycoides*!

Обнаруживается *B. cereus* ss и в личинках различных насекомых, например, жёлтолихорадочного комара (*Aedes aegypti*) и зелёной мясной мухи (*Lucilia sericata*). Причём его роль в их жизни пока непонятна, поскольку в отличие от *B. thuringiensis*, некоторые штаммы которого синтезируют Bt-токсины, убивающие личинки (читайте: «переводящие» в состояние питательного субстрата), *B. cereus* ss не выделяет инсектицидных токсинов, и взаимоотношение, скорее всего, является симбиотическим. Эту мысль, в частности, подтверждает тот факт, что *B. cereus* ss часто выделяют от личинок медоносных пчёл (*Apis mellifera*), которых он защищает от инфекции, вызываемой *Paenibacillus larvae*.

Однако нужно помнить, что бактерии могут выделяться не только из своих экологических ниш и *B. cereus* ss не является исключением, поскольку, в отличие от сибиреязвенного микроба, не «привязан» к рН почвы. Причём выделенные штаммы нередко обладают какими-то новыми, подчас удивительными, свойствами. Так, например, штамм *B. cereus* C1, выделенный из ила пруда для разведения сомов в провинции Чау Тхань (Вьетнам)^{<2>}, способен разлагать амоксициллин, который применяют при разведении рыб. Штамм *B. cereus* RA23, выделенный из нефтешлама^{3,<4>}, эффективно разлагает поливиниловый спирт, а штамм, выделенный из морской

¹ Swiecicka I., Mahillon J. Diversity of commensal *Bacillus cereus sensu lato* isolated from the common sow bug (*Porcellio scaber*, *Isopoda*). FEMS Microbiol Ecol. 2006; 56(1):132–140; DOI: 10.1111/j.1574-6941.2006.00063.x.

² Duong-Nguyen T. A., Pham M. H., et al. Amoxicillin degradation ability of *Bacillus cereus* C1 isolated from catfish pond sludge in Vietnam. Heliyon. 2022; 8(11):e11688; DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e11688.

³ Отходы, образующиеся в результате добычи, переработки и транспортировки нефти. Состоят из нефтепродуктов, воды и механических примесей (глина, песок, металлы), из-за чего представляют большую опасность для окружающей среды. Подавляющая часть нефтешламов подвергается захоронению.

⁴ Ullah M., Li H., et al. Polyvinyl alcohol degradation by *Bacillus cereus* RA23 from oil sludge sample. 3 Biotech. 2019; 9(10):350; DOI: 10.1007/s13205-019-1882-6.

воды в порту Сурабая (Индонезия), – дизельное топливо^{<1>}. Штамм *B. cereus* HF10, выделенный из ризосферы тростника, произрастающего на побережье залива Ячжоу (Китай), значительно подавляет рост грибка *Sclerotinia sclerotiorum*, вызывающего гниль некоторых растений^{<2>}. Штамм, выделенный с поверхности египетской железной руды, способен смещать изоэлектрические точки и за счёт высокого сродства к гематиту (Fe_2O_3) использоваться для эффективно-го обогащения железной руды благодаря отделению примесей кремнезёма^{<3>}. Продолжать можно долго.

Вплоть до недавнего времени *B. cereus* ss рассматривался исключительно в качестве младшего безобидного брата сибиреязвенного микроба, поскольку, в отличие от него, не имел плазмид рХО1 и рХО2. Поэтому даже случаи выделения из клинического материала списывались на контаминацию. Тем не менее уже по прошлым главам Вы могли понять, что эта «лошадка» не так проста, поскольку существуют штаммы, имеющие схожие плазмиды, но которые за счёт синтеза экзополисахаридной капсулы оказываются ещё более вирулентными для человека и животных. Но о них мы уже говорили (если хотите освежить информацию в памяти, то это Главы 4 и 16), сейчас же настало время поговорить о «классических» штаммах, поскольку они также полны сюрпризов.

¹ Kurniawan A., Wahyuni A. R. T., et al. *Harnessing Bacillus cereus from Surabaya seawater for enhanced diesel fuel bioremediation in Tropical Ocean*. Trends in Sciences. 2024; 21(7):7616; DOI: 10.48048/tis.2024.7616.

² Ma W., Ding J., et al. *A novel strain of Bacillus cereus with a strong antagonistic effect specific to Sclerotinia and its genomic and transcriptomic analysis*. Microorganisms. 2024; 12(3):611; DOI: 10.3390/microorganisms12030611.

³ Selim K. A., Rostom M. *Bioflocculation of Iron oxide – Silica system using Bacillus cereus bacteria isolated from Egyptian iron ore surface*. Egyptian Journal of Petroleum. 2018; 27(2):235–240; DOI: 10.1016/j.ejpe.2017.07.002.

На хромосоме *B. cereus* ss расположены гены, ответственные за синтез нескольких токсинов. Так, гены *hblD*, *hblC* и *hblA* кодируют синтез белков L₁, L₂ и В, составляющих **гемолизин ВL** (Hbl, от англ. hemolysin BL), впервые выделенный^{<1>},⁽²⁾ из штамма *B. cereus* F837/76, изолированного из послеоперационной раны. Ещё три хромосомных гена *nheA*, *nheB* и *nheC*, входящие в оперон *nheABC*, синтезируют белки NheA, NheB и NheC, составляющие **негемолитический энтеротоксин** (Nhe, от англ. nonhemolytic enterotoxin), впервые выделенный^{<3>} из штамма *B. cereus* NVH 0075/95, ставшего причиной крупной вспышки пищевого отравления в Норвегии. Оба белковых комплекса, равно как и соответственные белки, их составляющие, весьма похожи и не обнаруживают значительного сходства с другими белками⁽⁴⁾, ввиду чего предполагают, что соответствующие гены, их кодирующие (которые также весьма похожи), произошли от общих предковых генов. Однако их эволюция, по-видимому, шла разными путями. Так, гены гемолизина ВL (как и гены цитотоксина К, речь о котором пойдёт дальше) в основном передавались путём горизонтального переноса (между бактериями), а гены негемолитического энтеротоксина – преимущественно вертикальным путём (от родительской клетки к дочерней).

Гемолизин ВL и негемолитический энтеротоксин образуют поры в клетках, приводя к их осмотическому лизису («вытеканию» содержимого клетки), однако механизм этого процесса до конца не ясен. Наиболее вероятно, что белки, составляющие гемолизин ВL, прикрепляются по отдельности, а белки, составляющие негемолитический энтеротоксин, – через NheB, поскольку клеточные рецепторы пока обнаружены только для него. Так или иначе, они приводят к осмотическому лизису энтероцитов тонкого кишечника, что

¹ Turnbull P. C., Jorgensen K., et al. *Severe clinical conditions associated with Bacillus cereus and the apparent involvement of exotoxins*. J Clin Pathol. 1979; 32(3):289–293; DOI: 10.1136/jcp.32.3.289.

² Изначально предполагалось, что токсин бинарный, поэтому его компоненты получили названия «L» (lytic – с англ. «литический») и «B» (binding – с англ. «связывающий»).

³ Lund T., Granum P. E. *Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from Bacillus cereus isolated after a foodborne outbreak*. FEMS Microbiol Lett. 1996; 141(2–3):151–156; DOI: 10.1111/j.1574-6968.1996.tb08377.x.

⁴ Кристаллическая структура третичной формы сходна с порообразующим токсином цитолизином А (Cly A) *E. coli*, ввиду чего выдвинуто предположение, что они составляют суперсемейство токсинов.

приводит к диарейному синдрому (из-за чего штаммы называют «диарейными»), а также проявляют гемолитическую и дермонекротическую активности, а также цитотоксическую активность к тканям сетчатки.

Ещё одним порообразующим белком является мономерный β -порин **цитотоксин К** (CytK, от англ. cytotoxin K), впервые выделенный^{<1>} из штамма *B. cereus* NVH 391/98, ставшего причиной вспышки пищевого отравления в доме престарелых во Франции, когда у нескольких человек развилась кровавая диарея, а трое погибли. Как и описанные ранее токсины, цитотоксин К также проявляет цитотоксическую, гемолитическую и дермонекротическую активности. Примечательно, что вскоре из штамма *B. cereus* NVH 1230/88 был выделен цитотоксин К, имеющий лишь 89 % сходства в аминокислотной последовательности с ранее выделенным (ввиду чего получил название CytK-2) и проявляющий в пять раз меньшую цитотоксическую активность из-за формирования небольшого количества пор. Позднее было установлено^{<2>}, что штамм *B. cereus* NVH 391/98 является новым геномвидом *Bacillus cytotoxicus*, ответственным минимум за два случая токсикоинфекций^{<3>}, а подавляющее количество штаммов *B. cereus* ss продуцируют именно CytK-2⁽⁴⁾.

Синтез рассмотренных токсинов регулируется белком PlcR. Это тот самый белок, что не секретируется сибиреязвенным микробом ввиду инактивации кодирующего его гена *plcR* однонуклеотидной мутацией. При этом PlcR является частью *системы кворума* (quorum sensing), и его активация зависит от небольшого пептида PapR,

¹ Lund T., de Buyser M. L., et al. *A new cytotoxin from Bacillus cereus that may cause necrotic enteritis*. Mol Microbiol. 2000; 38(2):254–261; DOI: 10.1046/j.1365–2958.2000.02147.x.

² Guinebretière M. H., Auger S., et al. *Bacillus cytotoxicus sp. nov. is a novel thermotolerant species of the Bacillus cereus Group occasionally associated with food poisoning*. Int J Syst Evol Microbiol. 2013; 63:31–40; DOI: 10.1099/ijs.0.030627–0.

³ Cairo J., Cherman I., et al. *Bacillus cytotoxicus – a potentially virulent food-associated microbe*. J Appl Microbiol. 2021; 132(1):31–40; DOI: 10.1111/jam.15214.

⁴ Штамм *B. cereus* NVH 883/00 синтезирует «классический» цитотоксин К (CytK-1), но не обладает цитотоксической активностью по причине малой продукции токсина (см. Fagerlund A., Brilliard J., et al. *Toxin production in a rare and genetically remote cluster of strains of the Bacillus cereus group*. BMC Microbiol. 2007; 7:43; DOI: 10.1186/1471–2180–7–43). Указанное свидетельствует в пользу того, что эффективность цитотоксина К зависит не столько от строения, сколько от синтезируемого количества.

который продуцируется по общему секреторному пути и реимпортируется (захватывается назад) транспортным белковым комплексом олигопептид-пермеазой, но уже в виде гептамера. Соответственно, увеличение плотности бактериальных клеток приводит к увеличению концентрации PapR внутри клеток, ввиду чего он взаимодействует с PlcR, обеспечивая его связывание с участком PlcR box, что приводит к активации генов токсинов. Последние продуцируются общим секреторным путём, хотя часть белков, вероятно, секретирована с помощью аппарата экспорта жгутиков, поскольку у безжгутиковых мутантов обнаруживается сниженная секреция токсинов.

Вторым β -порином является **гемолизин II** (HlyII, от англ. haemolysin II), который также проявляет гемолитическую и цитотоксическую активности, но не обладает диареогенным эффектом, вероятно, вследствие расщепления в тонком кишечнике. Интересно, что его синтез не зависит от PlcR, но, вероятно, регулируется геном *fur*, контролирующим поглощение железа. И это указывает на то, что гемолитическое действие данного токсина является механизмом, благодаря которому бактерия получает доступ к железу.

Цереолизин O (CLO, от англ. cereolysin O), также известный как гемолизин I, до недавнего времени не рассматривался в качестве токсина, хотя и является ещё одним β -порином. Однако исследование¹ штамма *B. cereus* H2, выделенного² из щетинок десятиногих ракообразных *Shinkaiia crosnieri*, собранных на глубине 1120,3 м глубоководного холодного просачивания в Южно-Китайском море³, показало его способность вызывать пироптоз (программируемую клеточную гибель). Обсуждая патогенез при сибирской язве (Глава

¹ Wang Y., Luo J., et al. *Bacillus cereus* cereolysin O induces pyroptosis in an undecapeptide-dependent manner. *Cell Death Discov.* 2024; 10:122; DOI: 10.1038/s41420-024-01887-7; Zhao, Y., Sun, L. *Bacillus cereus* cytotoxin K triggers gasdermin D-dependent pyroptosis. *Cell Death Discov.* 2022; 8:305; DOI: 10.1038/s41420-022-01091-5.

² Zhao Y., Jiang S., et al. *A virulent Bacillus cereus strain from deep-sea cold seep induces pyroptosis in a manner that involves NLRP3 inflammasome, JNK pathway, and lysosomal rupture.* *Virulence.* 2021; 12(1):1362–1376; DOI: 10.1080/21505594.2021.1926649.

³ Области дна, куда из трещин, образовавшихся в результате тектонической активности, выходят (просачиваются) сероводород, метан и насыщенные углеводородами жидкости. Вопреки названию, в местах просачиваний, как правило, температура несколько выше, чем в окружающих водах. В Южно-Китайском море просачивания обнаружили в 2004 году.

7), мы говорили, что *VclA*, расположенный на поверхности споры сибиреязвенного микроба, за счёт связывания с субъединицей *S1q* белка *S1* и, как следствие, активации системы комплемента по классическому пути обеспечивает попадание споры в макрофаг, где уже летальный фактор, синтезируемый вегетативной клеткой, активирует инфламмасому *NLRP1*, что приводит к пироптозу, но только у животных, поскольку белки, на которые нацелен летальный фактор, у человеческой инфламмасы *NLRP1* отсутствуют. Однако *B. cereus* H2 избрал другую стратегию, более простую и элегантную. Синтезируемый им цереолизин *O* связывается с холестерином плазматической мембраны и способствует образованию в ней поры, через которую осуществляется отток ионов калия. Кроме того, цереолизин *O* обеспечивает высвобождение активных форм кислорода, что в совокупности и приводит к активации инфламмасы *NLRP3*. И поскольку прямого связывания с инфламмасомой для её активации не нужно, пироптоз вызывается как в случае животных, так и человеческих макрофагов. Однако, как несложно догадаться, повышенное содержание холестерина в плазме приводит к ингибированию действия цереолизина *O*. Но не всё так просто. Оказывается, что синтезируемые штаммом *B. cereus* H2 цитотоксин *K* и гемолизин *VL* также приводят к пироптозу макрофагов по тому же механизму, что вынуждает нас по-новому взглянуть на патогенный потенциал штаммов *B. cereus* ss, обитающих в морских глубинах.

Ещё один токсин, нерибосомальная пептидсинтетаза **цереулид** (*cereulide*), кодируется генами *cesH*, *cesP*, *cesT*, *cesA*, *cesB*, *cesC* и *cesD*, составляющими кластер *ces*, который располагается на рХО1-подобной плазмиде pVCE8410 (ранее pCER270), а также может располагаться на плазмиде pCERE01. Первая плазида была выделена из штамма *B. cereus* F4810/72, ставшего причиной пищевого отравления пяти человек в Мидлсбро (Великобритания) в результате употребления контаминированного им жареного риса из китайского ресторана^{<1>},⁽²⁾, а вторая – из штамма *B. cereus* Kinrooi 5975с, став-

¹ Ehling-Schulz M., Fricker M., et al. *Cereulide synthetase gene cluster from emetic Bacillus cereus: Structure and location on a mega virulence plasmid related to Bacillus anthracis toxin plasmid pXO1*. BMC Microbiol. 2006; 6:20; DOI: 10.1186/1471-2180-6-20.

² Интересной особенностью данного штамма является его способность выживать в олиготрофных условиях (т. е. с низким содержанием питательных веществ) грунто-

шего причиной смерти семилетней девочки в Кинрой (Бельгия) в результате употребления контаминированных им макарон^{<1>}. Токсин представляет собой циклический додекадепсипептид с молекулярной массой 1,2 кДа и структурой [D–O–Leu–D–Ala–D–O–Val–D–Val]₃, обеспечивающей его устойчивость к нагреванию, а также действию желудочного сока и протеолитических ферментов кишечника. В результате он вызывает рвотный симптом (из-за чего штаммы называют «рвотными»), хотя механизм до конца не ясен. Известно только, что токсин в двенадцатиперстной кишке связывается с серотониновыми рецепторами 5-гидрокситриптамина 3 (5-НТ₃), что приводит к афферентной стимуляции блуждающего нерва и, как следствие, рвоте, что было продемонстрировано в опыте^{<2>} на гигантской белозубке (*Suncus murinus*).

Кроме того, цереулид способен повышать проницаемость клеточной мембраны гепатоцитов печени, способствуя «вытеканию» ионов калия и, следовательно, окислению жирных кислот, из-за чего ингибируется активность митохондрий, что в конечном итоге приводит к фúlьминантной печёночной недостаточности. Именно такой «сценарий» и произошёл с семилетней девочкой из Кинрой (Бельгия) в 2003 году^{<3>}, съевшей трёхдневный макаронный салат, в котором был цереулид, синтезированный уже известным нам штаммом *B. cereus* Kингоо1 5975с. Эта история особенно интересна, поскольку салат также ели её две сестры (9 и 10 лет) и два брата (9 и 14 лет), однако трое детей (девочки 9 и 10 лет, юноша 14 лет) съели лишь небольшое количество салата из-за его необычного запаха.

вых вод (16 °С) путём быстрого эволюционирования вегетативных клеток в смешанную популяцию, состоящую из спор и аспорогенных (т. е. неспособных к спорообразованию) вариантов, связанных с мутацией *spo0A*. Исследование одного такого варианта, VAR-F48, выявило его конкурентное преимущество по сравнению с родительским штаммом, поскольку перенаправление метаболизма в отсутствие *Spo0A* позволяет эффективнее использовать энергию (см. Rousset L., Alpha-Bazin B., et al. *Groundwater promotes emergence of asporogenic mutants of emetic Bacillus cereus*. *Environ Microbiol*. 2020; 22(12):5248–5264; DOI: 10.1111/1462–2920.15203). Данная стратегия весьма любопытна, поскольку именно спорообразование считается эффективным способ выживания.

¹ Hoton F. M., Andrup L., et al. *The cereulide genetic determinants of emetic Bacillus cereus are plasmid-borne*. *Microbiology*. 2005; 151:2121–2124; DOI: 10.1099/mic.0.28069–0.

² Agata N., Ohta M., et al. *A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett*. 1995; 129(1):17–20; DOI: 10.1016/0378–1097(95)00119–P.

³ Dierick K., Coillie E. V., et al. *Fatal family outbreak of Bacillus cereus-associated food poisoning*. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(8):4277–4279; DOI: 10.1128/JCM.43.8.4277–4279.2005.

Спустя 6 часов у семилетней девочки началась рвота, и ввиду ухудшения состояния её с семьёй доставили в отделение неотложной помощи местной больницы, где уже у остальных детей началась рвота. Далее, на фоне ацидоза и печёночной недостаточности у неё и её 9-летнего брата развился острый респираторный дистресс-синдром, из-за чего их перевели на искусственную вентиляцию лёгких и всех детей направили в больницу Лёвенского католического университета (Universitair Ziekenhuis Leuven). По дороге у девочки развилось лёгочное кровотечение, к которому по прибытии добавились сильные мышечные судороги. Спустя 20 минут она умерла – через 13 часов после того, как поела. Посмертная биопсия печени показала микрососудистый и обширный коагуляционный некроз. Её братья и сёстры выжили: 9-летний мальчик получал лечение по поводу острой печёночной недостаточности (аланинаминотрансфераза – 8656 ед/л при норме до 43 ед/л; аспартатаминотрансфераза – 12254 ед/л при норме до 44 ед/л), и позже функция печени восстановилась; двум девочкам проведена инфузионная терапия и заместительная терапия бикарбонатом, а старший ребёнок отделался лишь небольшой рвотой и находился под наблюдением. Возможно, кто-то думает, что это свойство цереулида данного штамма, однако ранее, в 1997 году¹ в Швейцарии, был похожий случай, когда мужчина и его 17-летний сын съели четырёхдневные спагетти с домашним песто, что также привело к развитию печёночной недостаточности и смерти юноши. Основной причиной этих трагедий видится не столько контаминация продуктов питания *B. cereus* ss, сколько нарушение гигиены питания – длительное хранение, пусть и в холодильнике, ведь, как было показано ранее, возбудитель способен выживать и при более низких температурах, продуцируя термостабильный токсин.

¹ Mahler H., Pasi A., et al. Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. N Engl J Med. 1997; 336(16):1142–1148; DOI: 10.1056/NEJM199704173361604.

К настоящему моменту видится очевидным, что *B. cereus* ss является этиологическим агентом двух типов токсикоинфекций, характеризующихся диарейной или рвотной симптоматикой. Обе формы протекают преимущественно в лёгкой форме и саморазрешаются в течение 1–2 дней, хотя, как Вы уже видели, могут приводить и к летальным исходам.

Диарейная форма является следствием продукции токсинов вегетативными клетками в тонком кишечнике, для чего в среднем необходимо 10^5 – 10^8 клеток возбудителя. Инкубационный период составляет 8–16 часов, хотя иногда период инкубации растягивается из-за более длительного достижения бактериями чувства кворума. Болезнь проявляется болью в области живота, водянистой диареей, к которым редко присоединяется тошнота и рвота, из-за чего заболевание бывает сложно дифференцировать от токсикоинфекции, вызванной *Clostridium perfringens*.

Рвотная форма является следствием употребления в пищу продуктов питания, содержащих цереулид в количестве не менее 8 мкг/кг массы тела (около 10^3 бактерий на грамм продукта). Вероятно, именно этим можно объяснить то, что из детей, съевших макароны салат, выжили более старшие дети (хотя данные о массе тела детей неизвестны, очевидно, что у семилетней девочки она самая маленькая). Дифференцируют заболевание с интоксикацией энтеротоксинами *Staphylococcus aureus*, которые также вызывают рвоту, но, как правило, с диареей.

Помимо пищевых отравлений, *B. cereus* ss способен вызвать ряд системных и местных инфекций. Рассмотрим следующий случай.

1998 год¹, Амстердам (Нидерланды). В Отделении неонатальной интенсивной терапии Медицинского центра Амстердамского свободного университета (Vrije Universiteit Medisch Centrum) у трёх новорождённых, находящихся на искусственном

¹ Van der Zwet W. C., Parlevliet G.a., et al. *Outbreak of Bacillus cereus infections in a Neonatal Intensive Care Unit traced to balloons used in manual ventilation.* J Clin Microbiol. 2000; 38(11):4131–4136; DOI: 10.1128/jcm.38.11.4131–4136.2000.

вентиляции лёгких, развился сепсис, который в случае одного ребёнка, несмотря на антибиотикотерапию (амоксциллин и цефотаксим), привёл к смертельному исходу. Исследование аспирата трахеи, а также крови и ликвора показали присутствие в них только *V. cereus* ss. В дальнейшем в период с января по август *V. cereus* ss был выделен ещё от 35 младенцев.

Проведённое эпидемиологическое расследование показало, что *V. cereus* ss регулярно выделялся из трахеальных аспиратов младенцев, проходивших лечение за год до описываемых событий (в 1997 году), однако это не рассматривалось как повод для беспокойства штатными эпидемиологами, поскольку обычно бактерия не вызывает регулярных инфекций.

Было установлено, что причиной инфекции младенцев является контаминация возбудителем внутренней части выходного отверстия баллонов для ручной вентиляции лёгких, которые используются непосредственно перед подключением к аппарату искусственной вентиляции лёгких (в том числе во время транспортировки или очистки аппарата). Возбудитель с воздухом попадал на слизистую трахеи и закреплялся благодаря ссадинам, полученным при установке осциллирующей трубки аппарата (первое время после подключения аспираты содержали примесь крови). Регистрация пяти новых случаев колонизации после стерилизации баллонов методом автоклавирования указала на ещё один механизм передачи возбудителя – через руки медицинских работников.

Внедрение контроля за стерилизацией баллонов (ранее их протирали 70%-ным раствором этилового спирта, не эффективным в отношении *V. cereus* ss) и соблюдением правил асептики персоналом привело к отсутствию выделения возбудителя с сентября того же года.

Внимательный читатель, вероятно, уже давно заметил, что через всё повествование красной нитью проходит мысль о важности грамотной работы эпидемиолога. И этот случай не исключение. Конечно, до сих пор можно встретить тех, кто пренебрежительно относится к *V. cereus* ss, а в 1998 году, очевидно, таковых было гораздо больше, но тем не менее уже за пять лет до описываемых событий

сообщалось^{<1>} о колонизации бактерией аппарата искусственной вентиляции лёгких, приведшей к смерти одного пациента. А это значит, что смерти младенца в 1998 году можно было избежать, всего лишь поменяв дезинфектант и проведя разъяснительную работу с персоналом, потому что своей приоритетной задачей хороший эпидемиолог должен видеть предотвращение вспышки, а не её последующее расследование.

Конечно, не всегда всё так очевидно, особенно когда дело касается иммунонекомпетентных пациентов, поскольку, с одной стороны, имеется пациент с лихорадкой, из крови которого высеивается **только** *B. cereus* ss, а с другой – неожиданный источник с непонятным механизмом инфицирования. Так, у 17-летней пациентки с острым лимфобластным лейкозом, проходившей курс химиотерапии в Детской исследовательской больнице святого Иуды (St. Jude Children's Research Hospital) в штате Мемфис (США), бактериемия, вызванная *B. cereus* ss, развилась на фоне обильного употребления заварного зелёного чая (*Camellia sinensis*)^{<2>}. Возбудитель обнаружили в большинстве чайных пакетиков, однако другие пациенты инфицированы не были ввиду меньшего потребления чая. Примечательно, что в других напитках, таких как кофе, соки и газированные напитки, возбудитель обнаружен не был. В другом случае^{<3>}, произошедшем в США, у 51-летнего пациента с терминальной стадией почечной недостаточности образовалась псевдоаневризма на артериовенозном графте (arteriovenous graft), установленном шесть лет назад для проведения гемодиализа, что потребовало операционного вмешательства (**Рис. 28.1**). Последующее исследование показало колонизацию графта *B. cereus* ss, при том, что посеvy крови были чистыми, а графт спустя год использования оставался в организме, не используемым в течение пяти лет. В ещё одном случае^{<4>}, произошедшем в Японии, в Медицинской и стоматологической боль-

¹ Bryce E. A., Smith J. A., et al. *Dissemination of Bacillus cereus in an intensive care unit*. Infect Control Hosp Epidemiol. 1993; 14(8):459–462; DOI: 10.1086/646779.

² El Saleeby C. M., Howard S. C., et al. *Association between tea ingestion and invasive Bacillus cereus infection among children with cancer*. Clin Infect Dis. 2004; 39(10):1536–1539; DOI: 10.1086/425358.

³ McKinley T., Burnham B., et al. *Surely you can't B. cereus: Bacillus cereus infection resulting in spontaneous pseudoaneurysm of a nonaccessed arteriovenous graft*. J Vasc Surg Cases Innov Tech. 2023; 9(4):101333; DOI: 10.1016/j.jvscit.2023.101333.

⁴ Dohmae S., Okubo T., et al. *Bacillus cereus nosocomial infection from reused towels in Japan*. J Hosp Infect. 2008; 69(4):361–367; DOI: 10.1016/j.jhin.2008.04.014.

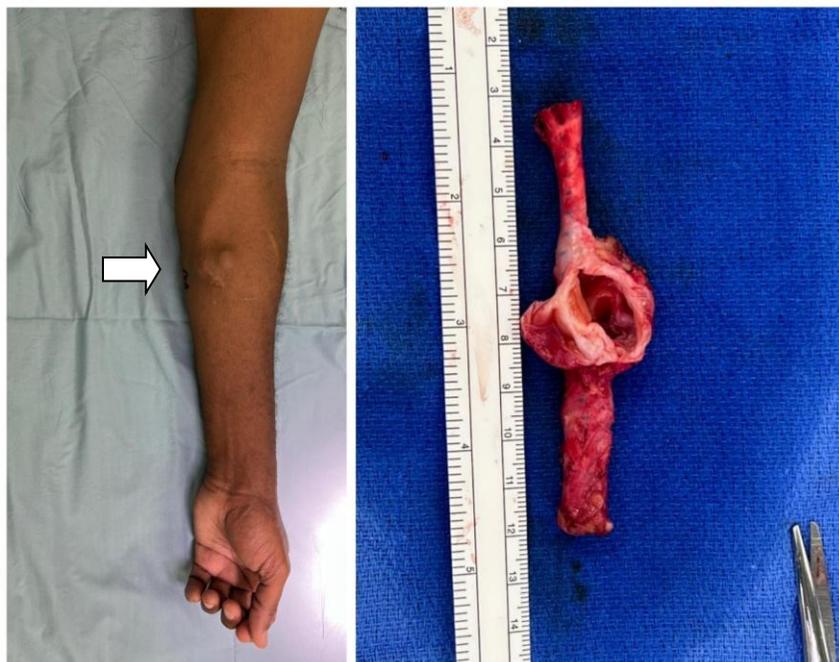


Рис. 28.1. Область отёка в месте расположения псевдоаневризмы (стрелка) и извлечённый артериовенозный графт (по McKinley T., 2023)

нице Университета Ниигата (新潟大学医歯学総合病院), заражение пациентов *B. cereus* ss произошло через выстиранные при 80 °C полотенца (10%/полотенце), а контаминированными оказались также стиральные машины, паровые сушилки и вода для ополаскивания. Примечательно, что большинство выделенных штаммов не несли генов, кодирующих синтез диарейных и рвотных токсинов, но проявляли устойчивость к ципрофлоксацину, эритромицину и тетрациклину. И тут надо сказать, что *B. cereus* ss не только выделяется из самых разнообразных мест, таких как перчатки, спиртосодержащие растворы для дезинфекции рук, внутривенные катетеры, трубки для сбора образцов и воздушные фильтры, а также образует биоплёнки⁽¹⁾, расширяя «ареал обитания», но и уверенно приобретает

¹ Интересно, что биоплёнки, обнаруженные на катетерах и марлевых салфетках, состояли не только из штаммов *B. cereus* ss, но и *B. thuringiensis*, которые также обнаруживались в крови пациентов (см. Kuroki R., Kawakami K., et al. *Nosocomial bacteremia caused by*

устойчивость к антибиотикам вне зависимости от агрессивности условий окружающей среды. И в этом смысле самыми показательными, пожалуй, являются два штамма из Китая, обладающие множественной лекарственной резистентностью: первый, *B. cereus* HB-SS-1, был выделен из трупa оленя Давида (*Elaphurus davidianus*)^{<1>}, а второй, *B. cereus* S66, – из загрязнённой радиацией почвы Синьцзян-Уйгурского автономного района^{<2>}. Применительно к клинике это говорит о потенциале штаммов *B. cereus* ss вызывать состояния, при которых для лечения пациента необходимо иметь данные по антибиотикочувствительности штамма, что требует времени, которого нет. Особенно это актуально в случае инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, которые в данном случае проще предотвратить, чем лечить.

Рассмотрим ещё один случай.

28 февраля 1953 год^{<3>}, Лисмор (Австралия). Спустя 8 месяцев после рождения третьего ребёнка у женщины развилась вторичная анемия, ввиду чего её доставили в больницу N для переливания крови. Донором выступил местный житель, молодой мужчина без внешних признаков инфекции.

После введения 800 мл донорской крови женщина почувствовала тошноту, к которой присоединились лёгкая тревога и сильная жажда. Процедуру немедленно прекратили. Чуть позже у неё началась рвота, однако спустя несколько часов она снова почувствовала себя хорошо.

Спустя 12 часов после начала переливания она почувствовала боль в левом глазу и пожаловалась на оптическую иллюзию в виде больших чёрных пятен, которые находились на некотором расстоянии от глаза, но были видны независимо от того, открыт глаз или закрыт. Утром следующего дня боль значительно усилилась, а

biofilm-forming Bacillus cereus and Bacillus thuringiensis. Intern Med. 2009; 48(10):791–796; DOI: 10.2169/internalmedicine.48.1885).

¹ Guo R., Tian Y., et al. *Biological characteristics and genetic evolutionary analysis of emerging pathogenic Bacillus cereus isolated from Père David's deer (Elaphurus davidianus)*. Microb Pathog. 2020; 143:104133; DOI: 10.1016/j.micpath.2020.104133.

² Song Z., Zhao Q., et al. *Draft genome sequence of multidrug-resistant β-lactamase-producing Bacillus cereus S66 isolated from China*. J Glob Antimicrob Resist. 2019; 17:23–24; DOI: 10.1016/j.jgar.2019.02.019.

³ Kerkenezov N. *Panophthalmitis after a blood transfusion*. Br J Ophthalmol. 1953; 37(10):632–636; DOI: 10.1136/bjo.37.10.632.

глаз мог уже воспринимать только наличие света. Спустя некоторое время эта функция тоже пропала. Веки стали отёчны, равно как конъюнктивы и роговица (на поверхности последней имелись буллы). Глаз слегка выпячивал (экзофтальм), и его подвижность стала несколько ограничена во всех направлениях. Зрачок сужен и неактивен. При пальпации глаз каменисто-твёрдый. Все симптомы указывали на панофтальмит (т. е. тяжёлое острое гнойное воспаление всех тканей и оболочек глаза). Глаз эвисцерирован (изъят) под общим наркозом, после чего пациентка пошла на поправку и спустя 7 дней была выписана. На протяжении всего периода болезни правый глаз оставался здоровым.

При исследовании эвисцерированного левого глаза был обнаружен гной с примесью крови в стекловидном теле. Посевы содержимого передней камеры глаза и стекловидного тела показали присутствие *B. cereus* ss. Посев конъюнктивы, осуществлённый до хирургического вмешательства, оказался чистым, что указывает на гематогенный занос возбудителя, хотя ответить однозначно, присутствовал ли он в донорской крови или она была им контаминирована уже после (например, через иглу), невозможно, поскольку перед переливанием посевов крови не проводилось.

Надо сказать, что в настоящее время такая ситуация почти невозможна ввиду того, что для взятия и переливания крови используются лишь одноразовые стерильные системы, а сама донорская кровь разделяется на компоненты, которые проходят много этапов проверки, включая карантинизацию плазмы минимум на полгода. Однако эндофтальмиты (т. е. инфекции внутренней части глаза), вызванные *B. cereus* ss, всё же случаются. Возможно, кто-то скажет, что женщина потеряла глаз из-за отсутствия антибиотикотерапии (в то время она только входила в клиническую практику), поэтому рассмотрим ещё случай.

2024 год¹ >, Сеул (Корея). В глазную больницу (세브란스안과병원) при Университете Ёнсе (연세대학교) поступает 9-летний мальчик с классической гемофилией (гемофилией А) с жалобами на внезапную головную боль, боль в животе и повы-

¹ Park H., Lee C. S., et al. *Bacillus cereus endophthalmitis in a child with hemophilia: a case report*. Korean J Ophthalmol. 2024;38(4):327–329; DOI: 10.3341/kjo.2024.0058

шение температуры до 38,3 °С, а также боль в правом глазу. При осмотре выявлен отёк роговицы и конъюнктивы, а также резкое снижение остроты зрения (до 0,01) и повышение внутриглазного давления до 45 ммНг (норма 10–20 ммНг). При этом левый глаз остаётся в норме. Анализ крови выявил лейкоцитоз ($16,4 \times 10^9/\text{л}$ при норме $4,5\text{--}10 \times 10^9/\text{л}$), повышение скорости оседания эритроцитов (27 мм/ч при норме 2–10 мм/ч) и незначительное повышение уровня С-реактивного белка (5,7 мг/л при норме до 5 мг/л). Учитывая высокую вероятность развития системной инфекции начата антибиотикотерапия (цефтриаксон); введение препаратов для снижения внутриглазного давления результата не дало.

На следующий день отёк века увеличился и появился экзофтальм (Рис. 28.2-А,В). Количество лейкоцитов возросло до $18,95 \times 10^9/\text{л}$, а также повысилось количество маркеров воспаления (скорость оседания эритроцитов до 110 мм/ч, уровень С-реактивного белка до 83,4 мг/л). Начата местная антибиотикотерапия глазными каплями (цефазолин и тобрамицин) в дополнение к цефтриаксону, а также препаратами, снижающими внутриглазное давление.

Ультразвуковое исследование правого глаза показало внутриглазное помутнение и утолщение склеры (Рис. 28.2-С), а компьютерная томография с контрастом выявила протрузию и ретробульбарную инфильтрацию (Рис. 28.2-Д), что в совокупности позволило заподозрить эндофтальмит. Выполнены витрэктомия (т. е. частичное или полное удаление стекловидного вещества) и лентэктомия (т. е. замена хрусталика) с субконъюнктивальными и интравитреальными инъекциями антибиотиков (ванкомицин, цефтазидим, вориконазол и дексаметазон). Во время проведения оперативного вмешательства обнаружены фибринозная мембрана, покрывающая зрачок, и диффузный некроз сетчатки (Рис. 28.2-Е).

После операции температура тела пришла в норму, прошли боль в глазу, периорбитальный и конъюнктивальный отёк, а также экзофтальм. Нормализовался уровень лейкоцитов, а количество маркеров воспаления значительно снизилось (скорость оседания эритроцитов до 50 мм/ч, уровень С-реактивного белка до 7,5 мг/л). Пациент пошёл на поправку. Однако светоощущение отсутствовало, сетчатка осталась некротичной, а зрение было потеряно

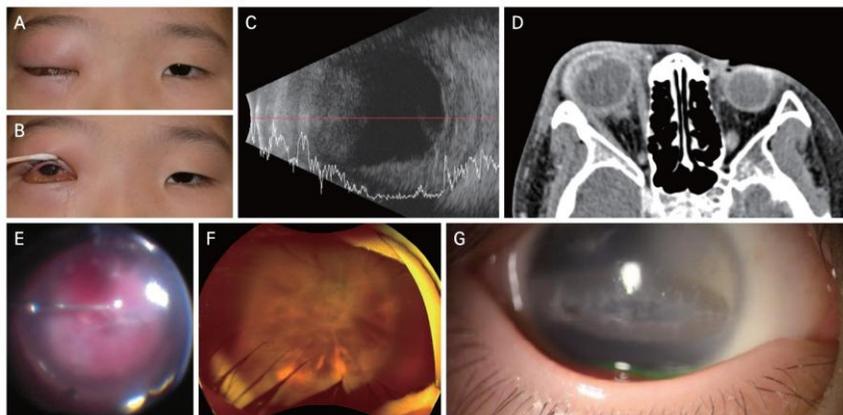


Рис. 28.2. Экзогенный эндофтальмит, вызванный *B. cereus ss*, у 9-летнего мальчика с гемофилией А (по Park H., 2024):

А и В – отёк века, роговицы и конъюнктивы, а также экзофтальм правого глаза;

С – ультразвуковое исследование, показывающее внутриглазное помутнение и утолщение склеры;

Д – компьютерная томография с контрастом, на которой обнаруживается протрузия и ретробульбарная инфильтрация.

Обратите внимание на размеры правого глаза;

Е – интраоперационные находки; можно видеть фибринозную мембрану, покрывающую зрачок, и диффузный некроз сетчатки;

Ф – широкополюсная фотография глазного дна (10-й день после операции);

Г – фотография переднего отрезка правого глаза, показывающая полосчатую кератопатию через 8 месяцев после операции

(Рис. 28.2-Ф), несмотря на две дополнительные интравитреальные инъекции ванкомицина. В течение следующего месяца пациент получал лечение глазными каплями, а восемь месяцев спустя была выявлена полосчатая кератопатия (т. е. помутнение роговицы в виде полос) с дефектом эпителия роговицы (Рис. 28.2-Г).

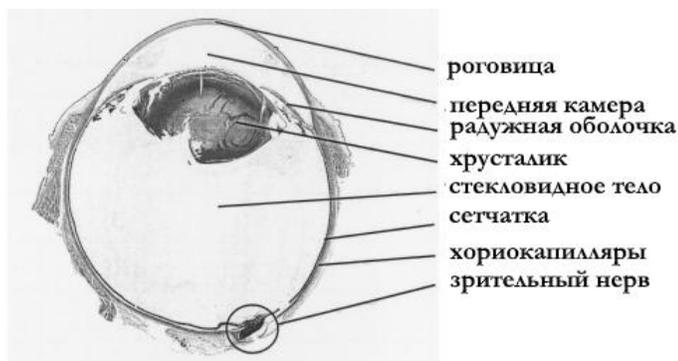
B. cereus ss был выделен из стекловидного тела, взятого во время операции, а также из хемопорта (т. е. имплантируемого под кожу аппарата для доставки препаратов), который был признан источником инфекции (механизм контаминации хемопорта неясен).

Оба рассмотренных случая относятся к эндогенным эндофтальмитам, которые чаще всего возникают вследствие использования контаминированных игл (преимущественно наркоманами), а также

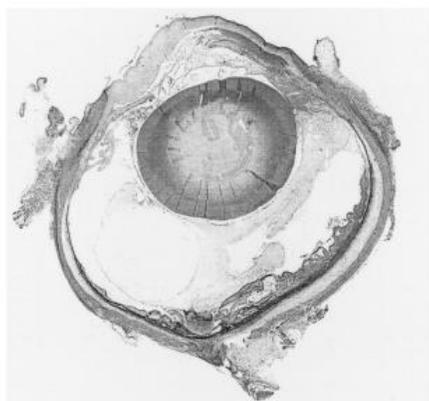
внутриглазного введения контаминированных препаратов многократного использования, в первую очередь – наркотиков, но крайне редко – и медицинских препаратов (можно предположить, что именно препарат стал причиной контаминации хемопорта во втором клиническом случае). *Экзогенные эндофтальмиты* обычно развиваются в результате травматических действий, например, в сельской местности или при операциях по удалению катаракты, а также как осложнение кератитов при использовании многократных контактных линз (в этом случае источником является жидкость для хранения линз).

Диагностику обоих состояний проводят путём немедленного парацентеза передней камеры глаза (т. е. введения иглы в переднюю камеру и взятия образца жидкости). Если же возбудитель не обнаруживается, исследуют стекловидное тело и кровь. Болезнь развивается стремительно. Классическими признаками являются боль в глазу, а также отёк или язва роговицы, к которым присоединяются отёк конъюнктивы, периорбитальный отёк, образование гноя в передней камере (гипопион) и экзофтальм. Также возможны головная боль, лихорадка и повышение количества лейкоцитов в крови. Снижение остроты зрения обычно наступает в первые 48 часов, поэтому предпочтительна ранняя антибиотикотерапия, однако прогноз в целом неблагоприятный. Так, в 70 % случаев инфекция приводит к полной потере зрения (без сохранения глаза в 48 % случаев), поскольку поражение тканей глаза продолжается даже после гибели возбудителя из-за синтезированных им токсинов. Кроме того, присутствие возбудителя (и его «фрагментов» после гибели) индуцирует иммунный ответ в виде каскада воспалительных событий, приводящих к продукции токсичных ферментов и активных форм кислорода, которые проникают в глаз через нарушенную действием токсинов структуру гематофтальмологического барьера. В конечном итоге это приводит к глобальным изменениям в архитектуре глаза и гибели нерегенерирующих ретинальных фоторецепторных клеток (**Рис. 28.3** и **Рис.28.4**).

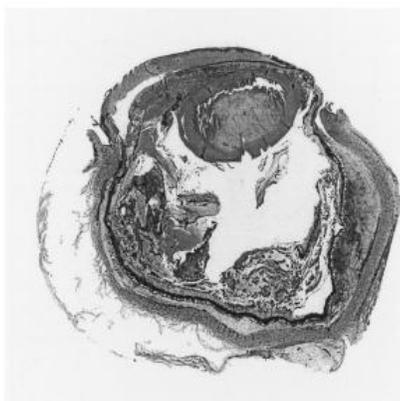
Невольно напрашивается вопрос: если возбудитель гематогенно заносится в глаз, то почему во всех ранее описанных случаях бактериемии этого не происходило? Вполне вероятно, что не все штаммы способны преодолеть гематофтальмологический барьер из-за



6 hours



9 hours



12 hours

*Рис. 28.3. Поражение глаза при эндофтальмите, вызванном интравитреальным введением *V. segetis* ss; окраска гематоксилин-эозином. Можно видеть, что к 6-му часу после заражения наблюдается небольшое воспаление, тогда как к 9-му часу оно становится обширным в заднем и переднем сегменте. Появляется выраженный отёк роговицы и конъюнктивы, а также поражение сетчатки. К 12-му часу задний и передний сегменты заполнены воспалительными клетками и фибрином, а структура глазного яблока начала разрушаться (по Callegan M. C., 2002; публикуется по лицензии the American Society for Microbiology; разрешение передано через the Copyright Clearance Center, Inc.)*

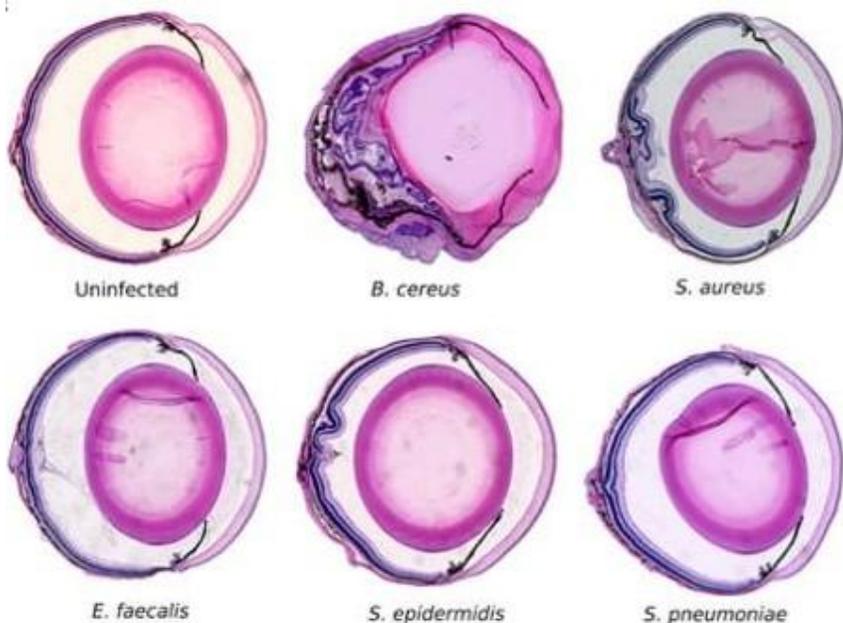


Рис. 28.4. Поражение глаза при эндофтальмите, вызванном *B. cereus* ss, в сравнении с бактериальными эндофтальмитами различной этиологии (по Mursalin M. H., 2020)

недостаточного синтеза порообразующих токсинов. Те, что преодолели, как правило, стремительно размножаются в стекловидном теле и мигрируют к сетчатке, которую активно колонизируют. Важный вклад вносит так называемое *роение бактерий*. Это такой вид поведения, при котором бактериальные клетки диссоциируют в длинные цепочки (читай: выстраиваются в ряд) и согласованно, при помощи жгутиков, перемещаются по поверхности. При этом находящиеся на краю колонии клетки отделяются, создавая собственные колонии. Из-за такого поведения возбудитель как бы расплзается по плоской поверхности сетчатки, «захватывая» большие территории. Интересно, что существует зависимость между способностью к роению и синтезом токсина. И как, возможно, Вы уже догадались, способные к роению штаммы продуцируют на порядок больше гемолизина BL, то есть вполне вероятно, что только способные к роению штаммы и могут преодолеть гематофтальмологический барьер.

Рассмотрим ещё один случай.

2003 год¹, Тюбинген (Германия). В больнице N у 24-летней девушки на 28-й неделе беременности путём кесарева сечения рождается здоровый мальчик весом 730 граммов (реанимационные мероприятия не потребовались). На 2-й день жизни младенца начато пероральное кормление хорошо усваиваемой гидролизованной смесью для недоношенных детей, однако на 3-й день начались проблемы с аппетитом, вялость, апноэ и брадикардия, ввиду чего потребовалась искусственная вентиляция лёгких. Начата антибиотикотерапия (цефотаксим, гентамицин и метронидазол). Диагностирован пневмоперитонеум (т. е. наличие свободного газа в брюшной полости), из-за чего пациент переведён в Больницу для детей и подростков Тюбингенского университета (Universitätsklinikum Tübingen – Klinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin).

При поступлении обнаружены генерализованные отёки, септический шок и значительно вздутый живот. Рентгенограмма брюшной полости подтвердила ранее поставленный диагноз. Анализ крови выявил снижение гемоглобина (116 г/л при норме 140–220 г/л), лейкопению ($1,28 \times 10^9/\text{л}$ при норме $9\text{--}30 \times 10^9/\text{л}$), тромбоцитопению ($28 \times 10^9/\text{л}$ при норме $100\text{--}420 \times 10^9/\text{л}$), повышение уровня С-реактивного белка (30 мг/л при норме 5–6 мг/л) и снижение протромбинового времени (48 %).

На диагностической (экспериментальной) лапаротомии обнаружено диффузное воспаление тонкой кишки с перфорацией в одном месте. Резецирован 12-сантиметровый некротизированный участок, и проведена энтеростомия (т. е. вывод тонкой кишки наружу через брюшную стенку). Ход операции осложнился тяжёлым септическим шоком, тяжёлым метаболическим ацидозом, анемией, тромбоцитопенией и диссеминированным внутрисосудистым свёртыванием, что потребовало массивных инфузий физиологического раствора, эритроцитарной массы, тромбоцитарной массы и плазмы. Введены адреналин и норадреналин в максимальной дозе 0,5 мкг/кг/мин. В образцах, взятых из брюшной полости (какие именно исследовались образцы, не уточняется, вероятно, фрагменты кишки), обнаружен только *B. cereus* ss.

¹ Girisch M., Ries M., et al. *Intestinal perforations in a premature infant caused by Bacillus cereus*. Infection. 2003; 31(3):192–193; DOI: 10.1007/s15010-002-3037-6.

Диурез снизился до 15 мл/сутки (норма 400–800 мл/сутки), а уровень креатинина сыворотки повысился сначала до 128,18 мкмоль/л (норма 21–37 мкмоль/л), затем до 212,16 мкмоль/л. Однако далее последовало небольшое улучшение состояния, которое быстро ухудшилось, из-за чего на 7-й день жизни проведена повторная операция, выявившая несколько перфораций кишечника и обширный перитонит. Резецировано четыре небольших участка некроза и выведены энтеростомы. В образцах, взятых из брюшной полости, снова обнаружен только *V. cereus* ss.

Далее пациент пошёл на поправку и на 16-й день осторожно начато пероральное кормление. На 17-й неделе проведена контрастная рентгенография дистальных отделов кишечника, после чего выполнено закрытие энтеростом с формированием анастомоза «конец в конец» (т. е. восстановлена целостность тонкой кишки).

Пациент выписан в возрасте 3 месяцев с микроцефалией и тяжёлой задержкой нейроразвития вследствие выявленного ещё на 3-й день инсульта, развившегося на фоне септических осложнений, вызванных *V. cereus* ss, которые затем перешли в тяжёлую двустороннюю перивентрикулярную лейкомаляцию (т. е. энцефалопатия с повреждением белого вещества головного мозга). Установить источник инфекции не удалось, однако очевидно, что развитие инфекционного процесса началось в желудочно-кишечном тракте.

Из представленного случая видно, что инфекции центральной нервной системы могут возникать вследствие гематогенного заноса не только, скажем, через контаминированную иглу, но даже через желудочно-кишечный тракт, когда в результате некроза слизистой оболочки кишечника возбудитель попадает в кровоток, хотя патогенез этого процесса всё ещё остаётся неясным. Тем не менее заболевание регистрируется только у иммунонекомпетентных людей, а также у младенцев, причём источник инфекции может быть самым неожиданным. Наиболее показательными являются два случая, произошедшие в Лейденском университетском медицинском центре (Leids Universitair Medisch Centrum), Нидерланды, с разницей в

четыре года. В первом случае^{<1>} заражение 19-летнего пациента, проходящего лечение от острого миеломоноцитарного лейкоза, произошло через пищу, содержащую незначительное количество возбудителя (в пределах допустимой нормы). Пациент находился в стерильной палате-изоляторе. Возбудитель, первоначально колонизировав горло, привёл к развитию менингита. Во втором случае^{<2>} заражение 18-летнего пациента, проходящего курс химиотерапии на фоне первой полной ремиссии острого лимфобластного лейкоза, произошло от падения. Дело в том, что перед помещением в стерильный изолятор для проведения химиотерапии ему разрешили немного погулять по территории больницы, где он случайно упал и поцарапал предплечье, что в конечном счёте привело к развитию токсического энцефалита. Оба случая имели летальный исход, причём во втором случае пациент изначально получал неэффективное лечение пенициллином, поскольку возбудитель неверно идентифицировали как *Clostridium* spp. (лаборатория посчитала более вероятным этот возбудитель, поскольку имелся контакт с землёй). И в этой связи рассмотрим ещё один случай.

1984 год^{<3>}, Норфолк (штат Виргиния, США). 20-летний морской пехотинец доставлен в Портсмутский военно-морской медицинский центр (Naval Medical Center Portsmouth) после того, как в результате защемления предплечья между двумя железнодорожными вагонами получил неполную травматическую ампутацию левой руки с открытым оскольчатым переломом лучевой и локтевой костей, а также полным нейроваскулярным нарушением. Пациенту проведено удаление некротизированной мышцы, открытая репозиция (т. е. сопоставление костных обломков через открытый доступ) и внутренняя фиксация лучевой и локтевой костей. Также проведена интерпозиционная венозная пластика лучевой и локтевой артерий для восстановления кровоснабжения (реваскуляризация руки). Общее время ишемии составило менее 4 часов. Нача-

¹ Golpin G. G., Guiot H. F., et al. *Bacillus cereus meningitis in a patient under gnotobiotic care*. Lancet. 1981; 2(8248):694–695; DOI: 10.1016/s0140-6736(81)91025-4.

² Guiot H. F., de Planque M. M., et al. *Bacillus cereus: a snake in the grass for granulocytopenic patients*. J Infect Dis. 1986; 153(6):1186; DOI: 10.1093/infdis/153.6.1186.

³ Johnson D. A., Alicino P. L., et al. *Bacillus cereus-induced myonecrosis*. J Trauma. 1984; 24(3):267–270; DOI: 10.1097/00005373-198403000-00015.

та антибиотикотерапия (цефазолин и гентамицин внутривенно).

На 3-й день температура резко поднялась до 38,7 °С; пациент почувствовал озноб и усиление боли в руке, которая заметно увеличилась в размерах (из раны выделялась водянистая жидкость коричневого цвета). Анализ крови выявил лейкоцитоз ($18,4 \times 10^9/\text{л}$ при норме $4,5\text{--}10 \times 10^9/\text{л}$), повышение уровня креатинфосфокиназы (6416 Ед/л при норме 190–270 Ед/л) и лактатдегидрогеназы (284 Ед/л при норме 135–225 Ед/л). В моче обнаруживался миоглобин. Из тканей выделены грамположительные палочки, ввиду чего была заподозрена газовая гангрена, вызванная *Clostridium perfringens*.

Выполнена открытая ампутация выше локтя из-за ухудшения клинического состояния, в ходе которой в тканевых полостях не было обнаружено гноя. Исследование тканей подтвердило газовую гангрену с присутствием грамположительных палочек в мышечных тканях (со стороны раны), идентифицированных как *C. perfringens*. Антибиотикотерапия скорректирована путём замены цефазолина на пенициллин G, и начат протокол гипербарической оксигенации для предполагаемой гангрены, вызванной *C. perfringens*.

На 2-й послеоперационный день вид микроорганизма был уточнён на *B. cereus* ss, исследование которого выявило устойчивость штамма к пенициллину, ампициллину, метициллину, цефалотину и цефокситину. Антибиотикотерапия скорректирована, гипербарическая оксигенация прекращена. На 10-й день антибиотики отменены, пациент выписан.

Данный случай не является единственным и наглядно показывает, что источник инфекции и схожесть клинической картины могут приводить к неверной идентификации возбудителя⁽¹⁾, которая, в свою очередь, приводит к неверной тактике лечения. Тем не менее поскольку *B. cereus* ss распространён повсеместно, он становится этиологическим агентом различных кожных инфекций, возникающих вследствие получения открытых ран (в основном в военное

¹ Газ, обнаруживаемый в ранах, в случае *B. cereus* ss, вероятно, является азотом, тогда как *C. perfringens* выделяет углекислый газ и водород.

время), огнестрельных ранений, инъекции препаратов (наркотиков) и, реже, проведения операций. Кроме того, инфицирование раны может произойти из-за колонизации бинтов, пропитанной гипсом марли, а также антисептиков, таких как хлоргексидин, повидон-йод и этиловый спирт. Первичная кожная инфекция также возможна, поскольку возбудитель может проникать через трещины в коже. Обычно она развивается у иммунокомпетентных лиц, контактирующих с землёй, и протекает местно, в виде эриматозной флегмоны, папулы, язвы и даже струпа (Рис. 28.5). Механизм и причины инфицирования неизвестны.



Рис. 28.5. Поражение кожи, вызванное *B. cereus* ss, у 33-летней женщины без сопутствующих заболеваний из Кум (Иран). Слов пациентки, на здоровой коже (без видимых ран, царапин и ушибов) возникли небольшие пузырьки, перешедшие в безболезненную рану. Из содержимого раны выделены только *B. cereus* ss; иные патологии отсутствуют. На фоне двухнедельного перорального приёма ципрофлоксацина (выделенный штамм чувствителен к гентамицину, ципрофлоксацину, хлорамфениколу и тетрациклину) рана зажила (по Esmkhani M., 2022)

Описаны единичные случаи эндокардитов и остеомиелитов у иммунонекомпетентных людей и героиновых наркоманов, причём первое состояние чаще всего развивается на фоне уже имеющихся сердечных патологий. Большой интерес также вызывает случай^{<1>}, произошедший в Нагоя (Япония), когда у 71-летней женщины с инвазивным раком мочевого пузыря спустя 5 недель после установки постоянного уретального катетера развилась лихорадка, а из мочи стал высеваться *B. cereus* ss. Назначенная антибиотикотерапия (имипенем + циластатин) привела к выздоровлению на 4-й день.

Итак, можно видеть, что *B. cereus* ss является этиологическим агентом большого спектра состояний, нередко приводящих к ле-

¹ Sato K., Ichiyama S., et al. *A case of urinary tract infection caused by Bacillus cereus.* J Infect. 1998; 36(2):247–248; DOI: 10.1016/s0163-4453(98)80032-7.

тальным исходам, но чаще всего у младенцев и иммунонекомпетентных лиц. При этом мы рассмотрели только инфекции, вызываемые «классическими» штаммами, не затрагивая *Bcbva* и штаммы с сибиреязвенноподобными плазмидами, поскольку они и вызываемые ими инфекции уже были подробно рассмотрены в Главах 4 и 16. Тем не менее до сих пор некоторые специалисты относятся к *B. cereus* ss пренебрежительно, упрямо закрывая глаза на его патогенный потенциал. Однако, как уже отмечалось, не только *B. cereus* ss, но и весь *B. cereus* complex всё чаще преподносит сюрпризы, ставя новые задачи перед здравоохранением и предлагая простую истину: вчера не равно сегодня, а сегодня не равно завтра. Бактериальные возбудители живут своей жизнью. Они размножаются, и многие обмениваются генами. Вчерашний представитель нормофлоры сегодня вызывает инфекцию. И задача очень проста – вовремя увидеть и предотвратить. Конечно, не нужно в этом деле доходить до безумия и в каждой бактерии подозревать потенциально опасный патоген (всё-таки у них презумпция невиновности), но нужно уловить едва заметные предпосылки и вовремя среагировать. И в этом сложность профессии врача.

29**ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА *B. CEREBUS* SS**

Лабораторная диагностика состояний, вызванных *B. cereus* ss, в целом похожа на диагностику сибирской язвы. Исследованию подлежит клинический материал и образцы окружающей среды, работу с которыми осуществляют в лабораториях BSL-2, поскольку возбудитель относится к ПБА 2 группы опасности (риска) согласно Всемирной организации здравоохранения и к III группе патогенности (опасности) в России¹. Такое положение объясняется тем, что он может вызывать заболевание человека и животных, но вряд ли представ-

¹ В США не входит ни в одну из категорий, поскольку не рассматривается как потенциальный агент биотерроризма.

ляет серьёзную опасность¹. Однако после предыдущей главы с этим утверждением хочется поспорить.

Лаборатории BSL-2 относятся к базовым и представляют собой герметичные помещения, разделённые на «чистую» и «заразную» зоны, оборудованные системами вентиляции с HEPA-фильтрами (класс H11 на входе и класс H14 на выходе). И в целом они похожи на лаборатории BSL-3, только к ним, равно как и к сотрудникам в них работающим, предъявляются менее жёсткие требования.

Образцы клинического материала и объектов окружающей среды подготавливают и сеют на питательные среды, такие как мясопептонный бульон, LB-агар, мясопептонный агар, агар Хоттингера, кровяной агар. Оптимальной температурой инкубации является 30–37 °С, однако существуют штаммы, растущие при более низких или, наоборот, более высоких температурах².

При выращивании в *бульоне* в течение суток происходит его помутнение с последующим просветлением и образованием тонкой плёнки, которая при встряхивании распадается на пристеночное кольцо и хлопьевидный осадок, опадающий на дно. Сибиреязвенный микроб, напомним, образует плотный осадок по типу комка ваты.

На *чашках* в первые сутки образуются восковые серебристо-белые (иногда розовато-коричневатые) колонии с неровными краями, имеющие зернистую структуру (R-форма), примерно 5–10 мм в диаметре, которые к 48-му часу увеличиваются до 2 см, однако размер может варьироваться в зависимости от штамма (**Рис. 29.1**). Похожие колонии формируют штаммы Vcbva и антроза-отрицательные штаммы сибиреязвенного микроба, правда, последние растут медленнее из-за задержки в споропрорастании (**Рис. 29.2**). В косо проходящем пучке света можно видеть ровные края колоний, хотя в ряде случаев может встречаться структура,

¹ *Laboratory biosafety manual. 3rd ed.* World Health Organization, WHO/CDS/CSR/LYO/2004.11, 2004, 181 p.

² Как и в случае *B. anthracis*, штаммы *B. cereus* ss, выделяемые из зоны вечной мерзлоты, не растут в жидких питательных средах, а на плотных, при температуре 37°C, колонии образуются лишь к концу третьих суток. При температуре инкубирования от 5 до 12°C рост возможен к 48 часу, а оптимум температурного роста располагается в диапазоне от 15 до 24°C.

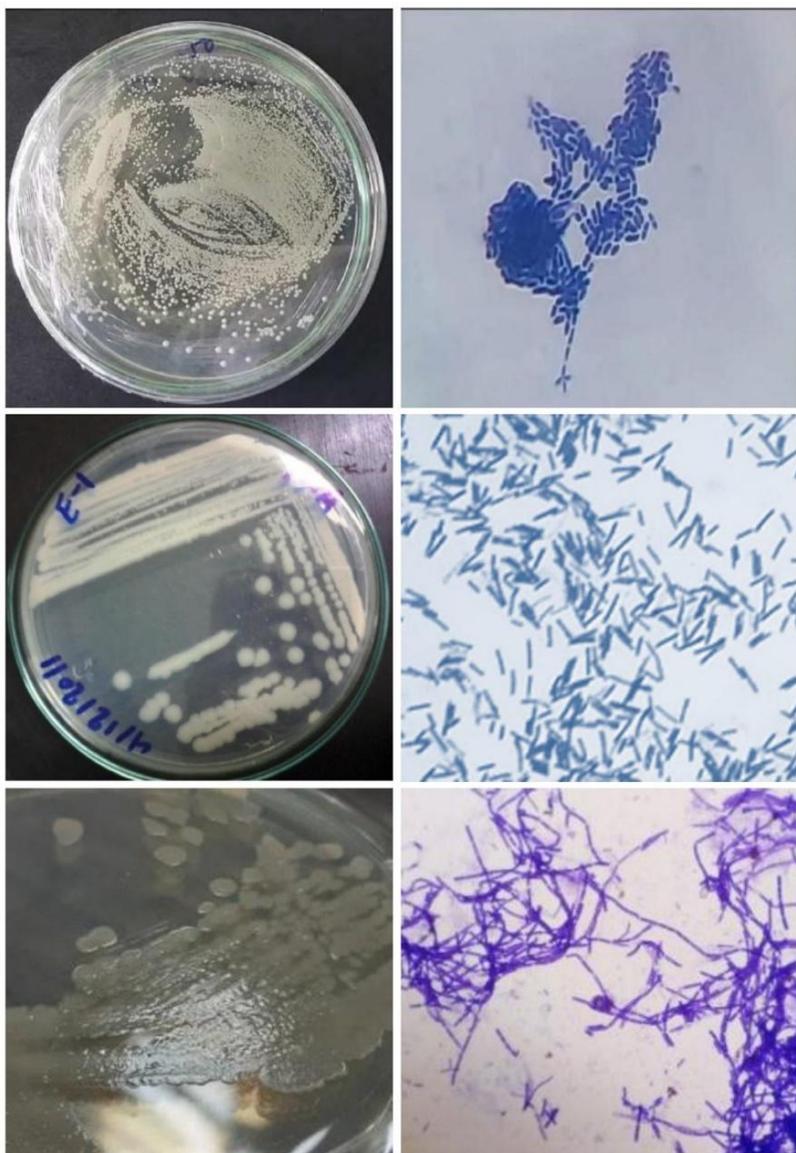


Рис. 29.1. Культуры *B. cereus* ss и их окраска по Граму: верхний ряд – штамм С1, выделенный из ила пруда для разведения сомов и способный биоразлагать амоксициллин (по Duong-Nguyen Т. А., 2022); средний ряд – штамм, выделенный с поверхности египетской железной руды (по Selim К. А., 2018); нижний ряд – штамм, вызвавший кожное поражение и проявляющий устойчивость к антибиотикам (по Esmkhani М., 2022)

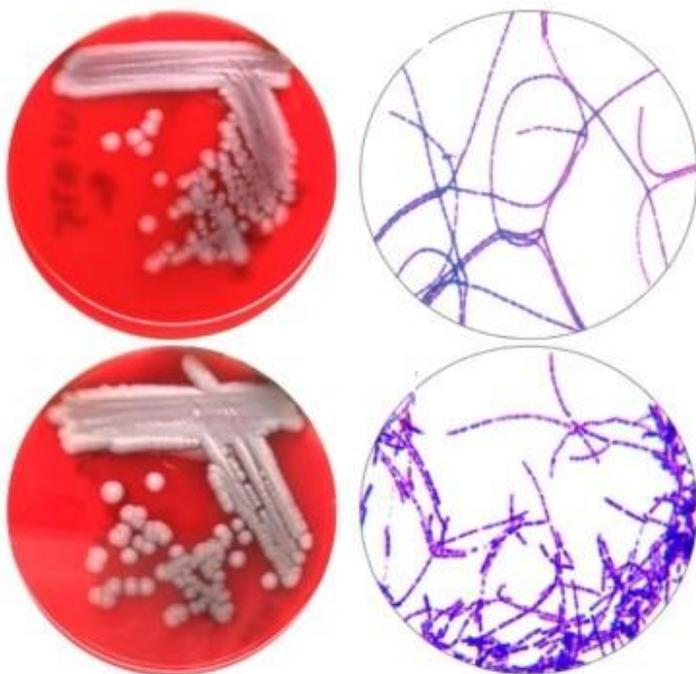


Рис. 29.2. Выращенные на агаре с овечьей кровью (слева) и окрашенные по Граму (справа) культуры антроза-отрицательного штамма *B. anthracis* из Нигерии (верхний ряд) и штамма *B. cereus* bv. *anthracis* (Vcbva) из Кот-д'Ивуара (нижний ряд), изолированного из останков дымчатого мангобея (*Cercopithecus atys*), умершего в период с мая 1993 по август 1994 года (по Norris M. H., 2023).

Обратите внимание, как схожи колонии обоих штаммов на чашках, но как отличаются клетки в мазках. Сравните их с культурами «классических» *B. anthracis* и *B. cereus* ss (подробнее о *B. anthracis* ^{ant-} и Vcbva мы говорили в Главах 2, 3, 7 и в Главе 4 соответственно)

похожая на львиную гриву, характерную для сибиреззенных колоний (Рис. 29.3).

Для окрашивания по Граму готовят фиксированные мазки¹ из клинического материала и суточных агаровых культур. В первом случае можно видеть крупные (1–2 x 3–5 мкм) прямые или слегка

¹ В лабораториях BSL-2, как правило, мазки фиксируют путём проведения в пламени спиртовки (горелки), однако видится целесообразным использовать фиксирующие растворы, применяемые для сибиреззенных культур, как было описано в Главе 21.

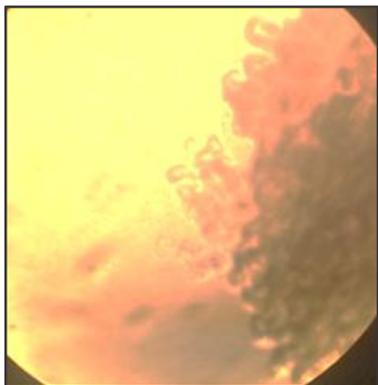


Рис. 29.3. Атипичная культура в коспроходящем пучке света. Сравните это изображение с **Рис. 21.2**

изогнутые тонкие палочки с квадратными концами, расположенные поодиночке или короткими цепочками с чётко визуализируемыми клеточными стыками (**Рис. 29.4**). Аналогичный вид имеют мазки, приготовленные из бульонных культур. В случае агаровых культур можно видеть крупные прямые палочки с более однородной морфологией, располагающиеся поодиночке или составляющие длинные цепочки (**Рис. 29.1**). Споры в таких культурах могут располагаться центрально, что позволяет их дифференцировать от сибиреязвенных.

Аналогичный вид имеют мазки, приготовленные из суточных культур штаммов *Vcbva*, в то время как в мазках антроза-отрицательных штаммов сибиреязвенного микроба обнаруживаются длинные цепочки, состоящие из маленьких клеток (**Рис. 29.2**).

Для обнаружения *жгутиков* используют фиксированные мазки 12–18-часовых агаровых культур, которые затем окрашивают и микрофотографируют при большом увеличении. Для этого аккуратно петлёй забирают культуру и помещают в пробирку с 2–3 мл физиологического раствора. Далее, петлю держат неподвижно примерно 2 минуты или осторожными движениями погружают 3–4 раза, чтобы не повредить жгутики. Дают отстояться 15–20 минут, после чего аккуратно помещают новую петлю в пробирку, и наносят одну каплю на предметное стекло (не размазывая!), и дают высохнуть. Фиксируют.

Для окраски по Лейфсону на предметное стекло наносят протравитель на 30–50 секунд¹ или 3–5 минут², после чего либо выдержи

¹ В этом случае в качестве протравителя используют смесь из 15 г таннина, растворённого при нагревании в 48 мл воды, к которому добавляют 30 мл насыщенного водного раствора железного купороса и 6 мл насыщенного раствора, состоящего из

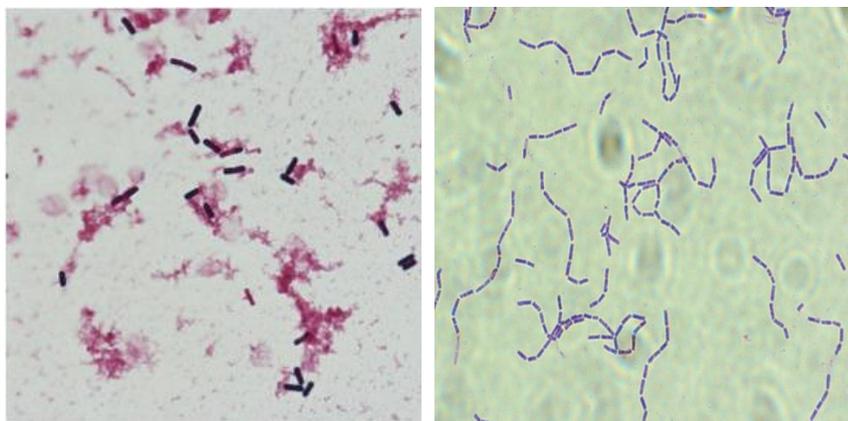


Рис. 29.4. Мазки крови (слева) и аспирата передней камеры глаза (справа); окраска по Граму (слева по Shimoiyama Y., 2017, справа по Mursalin M. H., 2020)

вают при комнатной температуре в течение 15–20 минут, либо нагревают до появления паров, после чего промывают сильной струёй дистиллированной воды примерно 30 секунд и высушивают на воздухе. Далее наносят карболовый фуксин Циля или смесь, состоящую из 1 части насыщенного спиртового раствора фуксина и 10 частей дистиллированной воды (при медленном нагревании до образования паров). Промывают дистиллированной водой и высушивают. В результате бактериальные клетки и их жгутики окрашиваются в розово-фиолетовый цвет (**Рис. 29.5**).

Можно видеть, что жгутики окрашиваются за счёт осаждения на них солей железа, однако для этих целей можно использовать и соли серебра (окраска по Морозову). На фиксированный мазок наносят раствор, состоящий из 1 мл ледяной уксусной кислоты и 2 мл

фуксина в 96%-ном растворе спирта. Смесь хранят в стеклянной таре с притёртой крышкой в тёмном месте. Перед использованием фильтруют. Хотя смесь может храниться несколько месяцев, целесообразнее её готовить за 1–2 дня до использования.

² В этом случае в качестве протравителя используют смесь из 20%-ного водного раствора таннина, 1 мл насыщенного спиртового раствора основного фуксина и 5,5 мл насыщенного на холоде водного раствора соли Мора (сульфата аммония-железа[III]). Смесь хранят в стеклянной таре с притёртой крышкой в тёмном месте. Перед использованием фильтруют. Хотя смесь может храниться несколько месяцев, целесообразнее её готовить за 1–2 дня до использования.



Рис. 29.5. Визуализация жгутиков единичных клеток (слева) и при роении (справа); окраска по Лейфсону (справа по Mursalin M. H., 2020)

формалина в 100 мл дистиллированной воды. Спустя минуту тщательно промывают дистиллированной водой. Наносят раствор, состоящий из 5 г таннина и 1 мл фенола в 100 мл дистиллированной воды¹, и подогревают в течение 1 минуты до появления паров, после чего тщательно промывают дистиллированной водой. Снова нагревают мазок и на 1 минуту наносят раствор аммиачного серебра², после чего тщательно промывают дистиллированной водой и высушивают. В результате бактериальные клетки окрашиваются в угольно-чёрный цвет, а их жгутики – в коричневый или янтарно-чёрный цвет на прозрачном или жёлтом фоне.

Окрашивают и иными способами. *Способ Лёффлера*: на фиксированный нагретый мазок наносят раствор, состоящий из 100 мл 20%-ного раствора водного таннина, 50 мл насыщенного на холоде водного раствора железного купороса и 10 мл насыщенного спиртового

¹ Наталья Никифоровна Клемпарская предлагает использовать 2,5–3%-ный раствор таннина во избежание образования осадков.

² Способ приготовления: 5 г нитрата серебра растворить в 100 мл дистиллированной воды, после чего отлить 20 мл раствора в отдельный сосуд, а к оставшимся 80 мл по каплям прилить водный раствор аммиака ($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) до растворения образовавшегося осадка и возникновения лёгкой опалесценции (если раствора аммиака добавлено много, то следует по каплям прилить первоначальный раствор из отлитых 20 мл). Полученный раствор развести в дистиллированной воде в соотношении 1 : 100.

го раствора основного фуксина. Спустя 1 минуту осторожно промывают дистиллированной водой и немного высушивают, после чего наносят карболовый раствор фуксина и прогревают 2–3 минуты. Тщательно промывают дистиллированной водой и высушивают. В результате бактерии окрашиваются в тёмно-фиолетовый цвет, а жгутики – в бледно-фиолетовый или красный цвета. *Способ Инуйе*: на фиксированный мазок наносят раствор, состоящий из 100 мл 20%-ного раствора водного таннина, 50 мл насыщенного на холоде водного раствора железного купороса и 10 мл насыщенного спиртового раствора основного фуксина. Спустя 1 минуту осторожно промывают дистиллированной водой и наносят раствор Мюра¹, прогревая 1,5 минуты. Тщательно промывают дистиллированной водой и высушивают. В результате бактерии окрашиваются в тёмно-фиолетовый цвет, а жгутики – в бледно-фиолетовый или красный цвет. *Способ Бениньетти и Джино*: за 2–3 дня до окраски приготавливают три раствора², которые непосредственно перед окрашиванием смешивают в пропорции 1 : 2 : 3 и отфильтровывают. Далее наносят на фиксированный мазок и прогревают в течение 2–3 минут, после чего промывают дистиллированной водой и высушивают. В результате бактерии окрашиваются в тёмно-фиолетовый цвет, а жгутики – в бледно-фиолетовый цвет.

Для обнаружения *спор* используют фиксированные мазки из 2–5-суточных культур или суточных культур, выращенных на голодном агаре. Окрашивают мазки по Цилю – Нильсену, кумасси синим или малахитовым зелёным по Шефферу – Фултону.

Для выявления *реакции на ацетилметилкарбинол тестом Фогес – Проскауэра*, 2,5 мл суточной бульонной культуры переносят в отдельную пробирку и последовательно добавляют 0,3 мл первого

¹ Способ приготовления: смешать 25 мл насыщенного водного раствора сульфата алюминия-калия (алюмокалиевых квасцов) и 5 мл насыщенного спиртового раствора основного фуксина. Профильтровать непосредственно перед использованием.

² Первый раствор: 1 г сульфата цинка и 15 г таннина в 100 мл дистиллированной воды. Второй раствор: насыщенный водный раствор сульфата алюминия-калия (алюмокалиевых квасцов), полученный нагреванием. Третий раствор: насыщенный спиртовой раствор генцианвиолета.

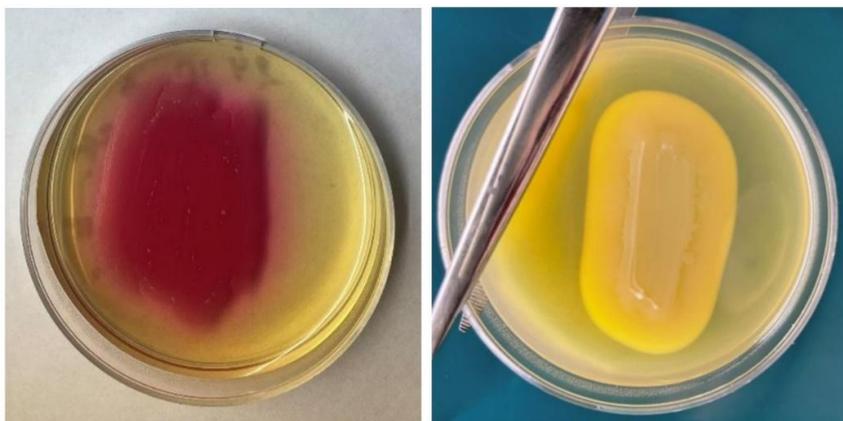


Рис. 29.6. Положительный тест на фосфатазную (слева) и лецитиназную (справа) активности

реагента¹ и 0,1 мл второго². Далее осторожно встряхивают и оставляют на 10–15 минут. Появление розово-красного окрашивания свидетельствует о положительном результате, свойственном штаммам *B. cereus* ss в той или иной степени.

Кроме того, они проявляют гемолитическую (на 1-е сутки), протеолитическую, лецитиназную и фосфатазную активности³. Последние две особенно показательны, поскольку большая часть сибиреязвенных штаммов не способна разлагать фенолфталеинфосфат натрия и сворачивать желток (**Рис. 29.6**). Отличаются штаммы *B. cereus* ss также подвижностью (**Рис. 21.8**) и отсутствием капсулообразования, однако всё же встречаются как малоподвижные и неподвижные штаммы, так и способные к капсулообразованию. Догадались, какие? Конечно же, *Vsbva* и вызывающие сибиреязвенную пневмонию сварщиков (**Рис. 29.7**).

¹ Способ приготовления: в 100 мл этилового спирта растворить 5 г α -нафтола. Полученный раствор (почти бесцветный) допустимо хранить год при температуре 2–8 °С.

² Способ приготовления: к 40 г гидроксида калия на водяной бане добавляют 100 мл воды (избегать перегрева!). Полученный раствор допустимо хранить год в стеклянной таре, покрытой парафином или полиэтиленом.

³ Методики приведены в Главе 21.

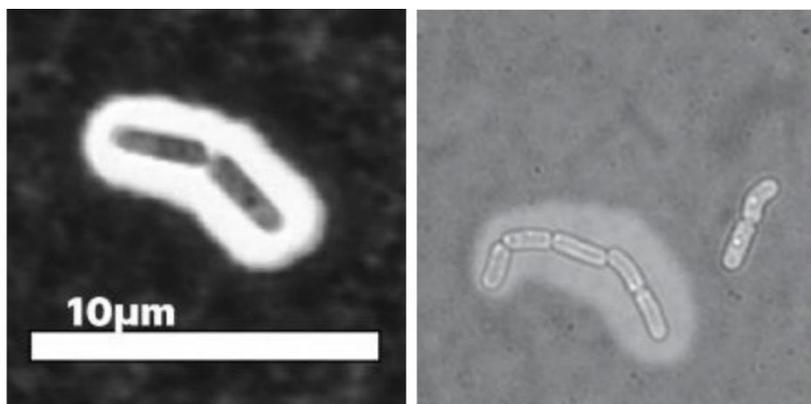


Рис. 29.7. Продукция капсулы штаммами *B. cereus* ss G9241 (слева) и *B. cereus* ss Elc2 (справа); окраска тушью (слева по Hoffmaster A. R., 2004; Copyright (2004) National Academy of Science, USA, публикуется с разрешения правообладателя; справа по Wright A. M., 2011; © 2010 College of American Pathologists, публикуется с разрешения правообладателя). Оба штамма являются этиологическими агентами сибиреязвенной пневмонии сварщиков и привели к летальным исходам. За синтез капсулы у первого штамма отвечает плаزمида pBC210, тогда как генетические детерминанты, ответственные за капсулообразование, для второго не определены, однако примечательно, что генетически он близок штаммам *B. anthracis* Ames Ancestor, *B. cereus* 03BB102 и *B. thuringiensis* Al Hakam

Для дифференцировки *B. cereus* ss от сапрофитных аэробов используют тест на способность к анаэробной ферментации глюкозы и маннита. Для этого исследуемую культуру уколom засевают в столбик питательной среды с глюкозой или маннитом, в которую дополнительно добавлен индикатор бромкрезоловый пурпурный. Спустя сутки инкубации при 37 °С при положительном результате среда окрашивается в жёлтый (жёлто-коричневый) цвет в случае глюкозы или не меняет цвет в случае маннита.

Помимо культуральных свойств штаммов исследуют их патогенность для лабораторных животных по методикам, представленным в Главе 22. Однако большинство штаммов *B. cereus* ss авирулентны для лабораторных животных (исключение составляют Vcbva и штаммы, вызывающие сибиреязвенную пневмонию сварщиков), а в случае «рвотных» и «диарейных» штаммов, чей патогенный потенциал связан в первую очередь с синтезом токсинов, необходимо исследовать токсичность, то есть заражать перорально, что

тоже не показательно ввиду различий в строении желудочно-кишечного тракта человека и используемых животных. Поэтому было предложено^{1>} вводить неочищенные центрифугированные супернатанты, причём внутрибрюшинно. Для этого споры возбудителя культивируют в богатой питательной среде, например, бульоне с сердечно-мозговым экстрактом (посевная доза 10⁴/мл) при 37 °С и 160 об/мин в течение 18 часов. Далее центрифугируют 10 минут при 8000 об/мин для получения содержащих токсина супернатантов, которые можно хранить при минус 20 °С.

Заражение мышей проводят путём введения 500 мкл супернатанта внутрибрюшинно, наблюдение осуществляют в течение 7 дней. Обычно одним штаммом заражают несколько животных, и в этом случае падёж хотя бы одного животного свидетельствует о токсичности штамма, а гибель всех – о летальности. Как правило, штамм, синтезирующий хотя бы два токсина, является летальным.

Вместе с тем этот способ не позволяет определить, какой именно токсин синтезирует штамм. Ответить однозначно можно только с помощью *высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии* (ВЭЖХ-МС), с помощью которой можно разделить смесь на компоненты и определить масс-спектр каждого из них. Но этот способ трудоёмкий и дорогостоящий. Поэтому для обнаружения, например, цереулида предлагалось использовать тесты на кормление обезьян^{2>}, а также тесты, основанные на его способности вызывать вакуолизацию культур клеток линии Нер-2^{3>} и снижать подвижность свиных сперматозоидов из-за повреждающей митохондрии активности^{4>}. Но эти тесты, являющиеся косвенными, тоже не так просты в реализации. Наиболее простым и привычным видится обнаружение генов токсинов методом ПЦР⁵. Конечно, это ука-

¹ Хлопова К. В., Бахтеева И. В., и др. *Способ определения острой токсичности супернатантов неантрацидных видов *Bacillus cereus* complex на мышинной модели*, в сб. *Материалы IX Национального конгресса бактериологов*, Москва, 17–19 сентября 2024 года, М.: Издательство «Династия», 2024, 160 с.

² Melling J., Capel B. J., et al. *Identification of a novel enterotoxigenic activity associated with *Bacillus cereus**. J Clin Pathol. 1976; 29(10):938–940; DOI: 10.1136/jcp.29.10.938.

³ Finlay W. J., Logan N. A., et al. *Semiautomated metabolic staining assay for *Bacillus cereus* emetic toxin*. Appl Environ Microbiol. 1999; 65(4):1811–1812; DOI: 10.1128/AEM.65.4.1811–1812.1999.

⁴ Hoornstra D., Andersson M. A., et al. *A new method for in vitro detection of microbially produced mitochondrial toxins*. Toxicol In Vitro. 2003; 17(5–6):745–751; DOI: 10.1016/s0887–2333(03)00097–3.

⁵ RU 2837898 C1, 07.04.2025; RU 2839472 C1, 05.05.2025.

жет только на присутствие генов, но не на их функциональность, однако в совокупности с определением токсичности на животных можно косвенно утверждать и о синтезе токсинов.

Раздел IV

Bacillus thuringiensis

1901 год. Инженер Исидатари Сигэтанэ¹ обнаруживает^{<2>}, что причиной заболевания 卒倒 *sotto* (с яп. «обморок»), то есть обморока тутового шелкопряда (*Bombyx mori*), при котором личинка теряет аппетит, становится вялой и умирает, является бактерия, которой, по названию болезни, он даёт название *Bacillus sotto*. Однако поскольку его открытие не было опубликовано на одном из языков бактериологии того времени (немецком или французском), оно не было замечено за пределами Японии. Поэтому спустя 10 лет эту же бактерию как причину схожего по симптоматике заболевания *flacherie* (с нем. «вялый») у гусениц мельничной огнёвки (*Ephestia kuehniella*) переоткрывает^{<3>} Эрнст Берлинер⁴. И поскольку дело происходит в Тюрингии (Германия), он даёт бактерии название *Bacillus thuringiensis*, под которым она и известна до сего дня. Что же касается названия *B. sotto*, то его в 1960 году присвоют одному из геноваров^{<5>}, определённых в 1985 году как подтип^{<6>}.

Эрнст Берлинер пишет: «Поражённые гусеницы внешне почти идентичны здоровым, за исключением того, что, подобно личинкам, готовящимся к окукливанию, они покидают место своего обитания. Однако им редко удаётся создать коконы. Болезнь стремительно прогрессирует, и вскоре обмякшие трупики висят на стенках или потолке своего контейнера. Тело тяжелобольной или погибшей гусеницы кажется мягким и дряблым, словно кожа обволакивает кашицу, а не упругие мас-

¹ 石渡繁胤, 1868–1941; японский инженер. Директор Киотосского института обучения шелководству (1908–1911).

² 石渡繁胤: 劇烈なる一種の軟化病(卒倒病)に就て(第一), 大日本蚕糸会報, 1901, 144, 1–5.

³ Berliner E. Über die Schlafsucht der Mehlmottenraupe (*Ephestia kuehniella* Zell.) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis* n. sp. Zeitschrift für Angewandte Entomologie. 1915; 2(1):29–56; DOI: 10.1111/j.1439-0418.1915.tb00334.x.

⁴ Ernst Berliner, 1880–1957; германский биолог, бактериолог. В период нацизма подвергался расовым и политическим преследованиям, включая ограничения в работе и запрет на публикации.

⁵ Heimpel A. M., Angus T. A. *Bacterial insecticides*. Bacteriol Rev. 1960; 24(3):266–288; DOI: 10.1128/br.24.3.266-288.1960.

⁶ Shibano Y., Yamagata A., et al. *Nucleotide sequence coding for the insecticidal fragment of the Bacillus thuringiensis crystal protein*. Gene. 1985; 34(2–3):243–251; DOI: 10.1016/0378-1119(85)90133-7.



Исиватару Сугэтанэ
(no 帝国発明家名鑑, 1937)



Эрнст Берлинер
(no Krieg A., 1986)

сы. И действительно, после разрушения кишечника, где *B. thuringiensis* начинает свою деятельность, разрушается всё тело гусеницы, постепенно превращаясь в жидкую молочную массу...»

Происходит это из-за того, что при попадании спор *B. thuringiensis* в среднюю кишку (желудок), под действием щелочной среды, параспоральное тело¹ лизируется, и из него выделяется кристаллический Bt-токсин (Рис. 30.1), проявляющий инсектицидные свойства, что было установлено к 1954 году (на subsp. *sotto*)², хотя первые опыты по использованию бактерии для борьбы с насекомыми проводились ещё в 1922 году в Зоологическом институте Марбурга³, поскольку бактерия была безопасна для человека и позвоночных животных. Так или иначе, на сегодняшний день из-

¹ Термин ввёл бельгийский зоолог Поль Дебезьё (Paul Debaisieux; 1886–1978), описавший формирование «придатков, прикреплённых к концам эндоспор, или спиралевидных структур, окружающих эндоспоры», у бацилл, выделяемых из кишечного тракта насекомых (см. Debaisieux P. *Organsmes bacilliformes à structure parasporale spiralée*. Ann Soc Sci Bruxe. 1926; 45:94–96; Debaisieux P. Structures parasporales chez les bactéries. Ann Soc Sci Bruxe. 1927; 47:89–90).

² Angus T. A. *A bacterial toxin paralyzing silkworm larvae*. Nature. 1954; 173(4403):545–546; DOI: 10.1038/173545a0.

³ Mattes O. *Parasitäre Krankheiten der Mehlmottenlarven und Versuche über ihre Verwendbarkeit als biologische Bekämpfungsmittel*. Sitzb. Ges. Beförd. ges. Naturwissensch. Marburg. 1927; 62:381–417.

вестно, что параспоральные тела *B. thuringiensis* содержат многокомпонентные кристаллические (Cry) и цитотоксические (Cyt) δ -эндотоксины, синтез которых кодируется плазмидными генами (поскольку генов много, условно их называют *cry* и *cyt*), поэтому отсутствие (потеря) плазмиды (плазмид), несущей эти гены, делает штамм авирулентным для личинок насекомых и, как уже говорилось ранее, генетически мало отличимым от *B. cereus* ss. Причём интересно, что обмен плазмидами возможен и осуществляется не только между штаммами *B. thuringiensis*, но и *B. cereus* ss, *B. mycooides* и даже *B. anthracis*! И тут сразу следует сказать, что внутри вида *B. thuringiensis* традиционно выделяется большое количество

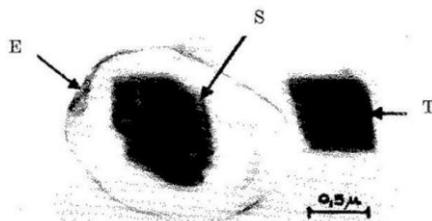
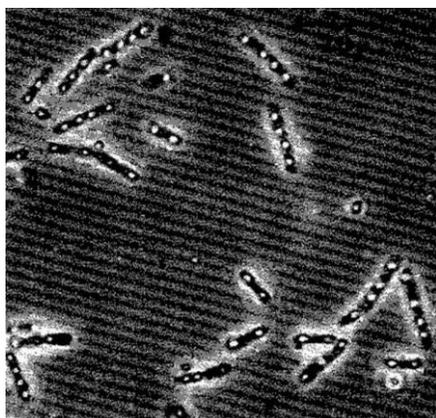


Рис. 30.1. Одни из первых фотографий параспорального тела *B. thuringiensis* (белые вкрапления на верхней фотографии и тёмные на нижней), содержащего кристаллический токсин: Е – спора; S – параспоральное тело; Т – кристалл (по Krieg A., 1961)

выделяется большое количество подвидов¹ (с одним из них, subsp. *sotto*, мы уже познакомились), многие из которых имеют собственные плазмиды и способны к токсинообразованию (причём каждый токсин активен в отношении личинок строго определённого круга насекомых), но только три из них наиболее часто применяются в сельском хозяйстве²:

¹ В настоящее время на основе геномных и фенотипических данных в этой классификации обнаруживается всё больше противоречий, однако она всё ещё «по привычке» используется специалистами. Иногда то, что принято считать фундаментом, так неповоротливо!

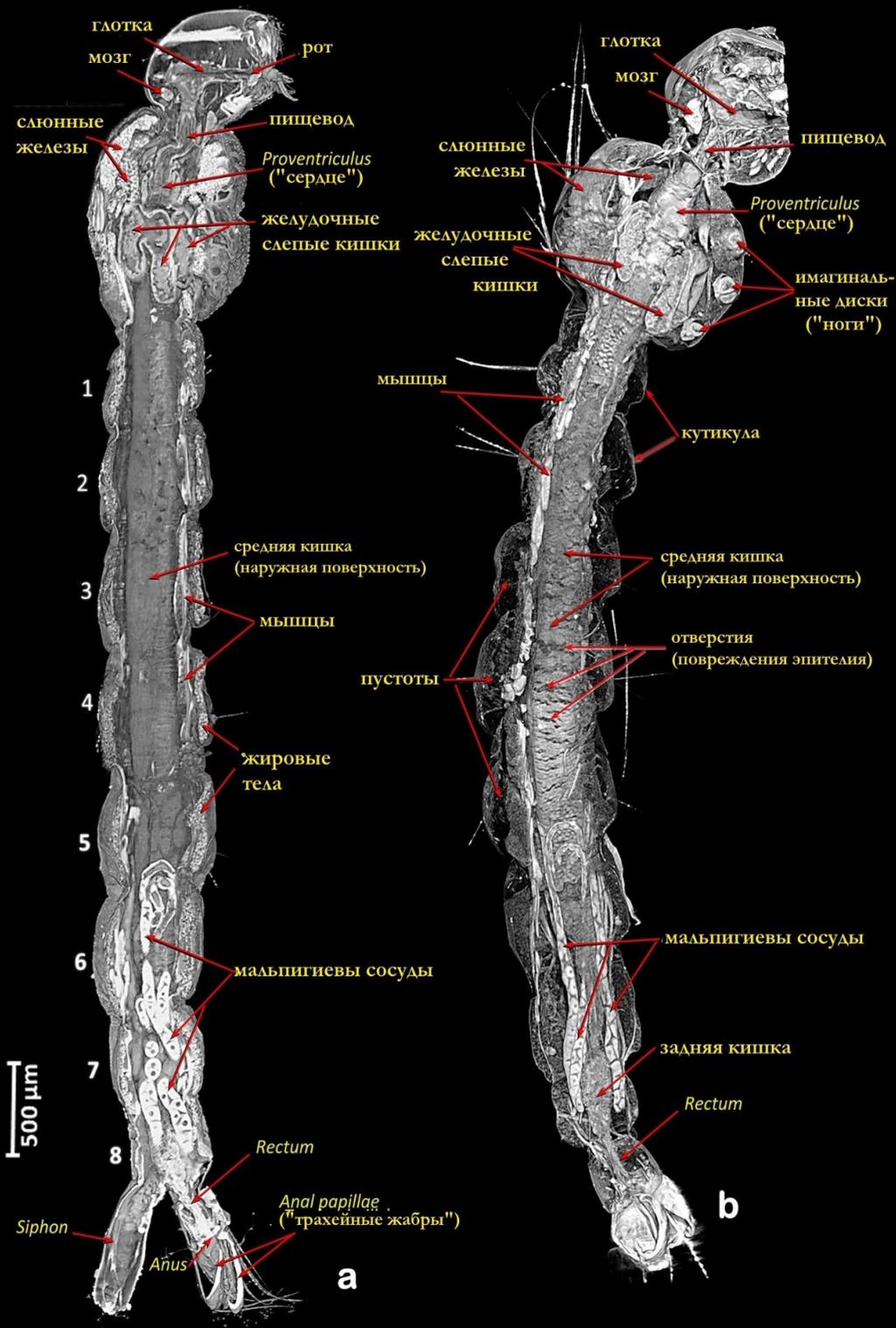
² Первый коммерческий препарат «Sporéine» стал выпускаться во Франции в 1938 году, а на сегодняшний день в сельском хозяйстве применяются препараты, включающие подтипы *kurstaki*, *israilensis*, *aizawai*, *san diego* и *tenebrionis*.

subsp. *kurstaki* и subsp. *aizawai*, чьи токсины активны в отношении личинок чешуекрылых насекомых, а также subsp. *israelensis*, выделенный в 1976 году из стоячего пруда в пустыне Негев (Израиль), чей токсин активен в отношении личинок различных видов комаров и мошек.

Последний подвид представляет особенный интерес, поскольку его параспоральное тело наиболее сложно устроено. Во время спорообразования на внешней поверхности споры формируется три белковых структуры, окружённых многослойным волокнистым матриксом, из которых два несут по одному белку (Cry11Aa1 и Cyt1Aa1), а третий – два белка (Cry4Aa1 и Cry4Ba1), причём белки Cry4Aa1, Cry4Ba1 и Cry11Aa1 являются кристаллическими, а белок Cyt1Aa1 – цитотоксическим. Затем структуры соединяются, формируя сферическое параспоральное тело, прикреплённое к базальному слою экзоспория. Матрикс, соединяющий структуры, имеет гексагональную структуру, с которой связываются белки Vt152, Vt148, Vt113, Vt073 и Vt075, причём белок Vt152 отвечает за процесс слияния структур, а Vt075, по-видимому, является капсулой, защищающей саму бактерию от цитотоксического действия Cyt1Aa1, и, как считается, происходит от главного капсидного белка какого-то бактериофага (вероятно ген, кодирующий Vt075, является профагом). Функция остальных белков пока не установлена.

Дальнейший механизм действия в целом схож у всех Vt-токсин-продуцирующих штаммов. Попав в среднюю кишку личинки, под действием щелочной среды параспоральное тело лизируется, высвобождая токсины, которые активируются пищеварительными ферментами, образуя поры в клеточной мембране клеток пищеварительного тракта (Рис. 30.2). В результате нарушается осмотический баланс, что приводит к лизису клетки. То есть в общем виде механизм действия очень похож на таковой у «диарейных» штаммов *V. cereus* ss. Лизис клеток приводит к скоплению жидкости в

Рис. 30.2. 3D-компьютерная томография (саггитальный срез) повреждений, возникающих у личинок жёлтолихорадочного комара (*Aedes aegypti*) спустя час после заражения *V. thuringiensis* subsp. *israelensis* (b) в сравнении с контролем (a). Обратите внимание на образовавшиеся поперечные щели, указывающие на лизис клеток пищеварительного тракта (по Alba-Tercedor J., 2023)

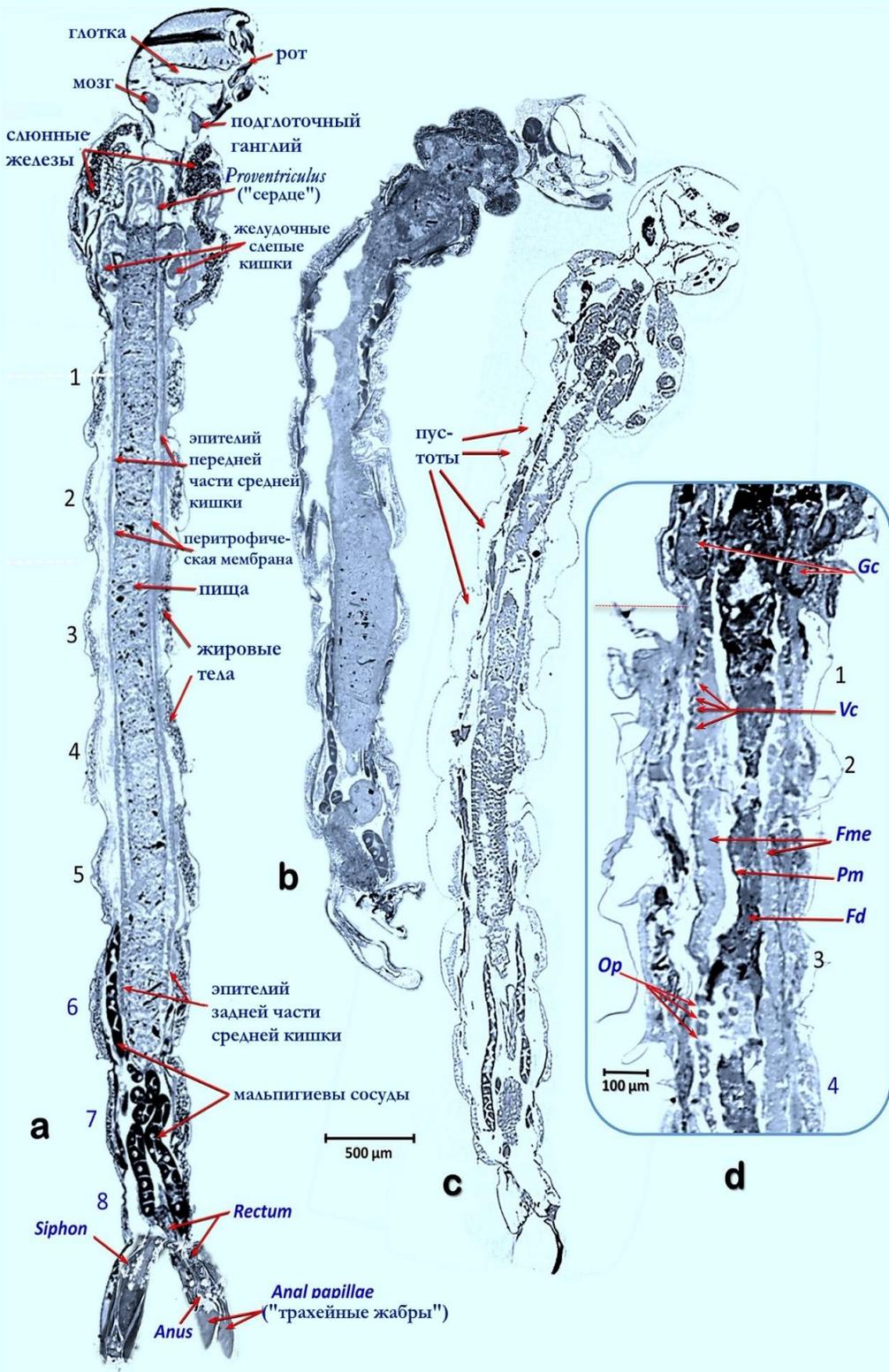


теле личинки, создавая пустое пространство между кутикулой и внутренними структурами, а также вызывая постепенную деформацию брюшка (визуально оно округляется), что можно видеть невооружённым глазом. Кроме того, происходит выброс содержимого средней кишки в гемолимфу, ввиду чего она ощелачивается, что приводит к нарушениям в работе нервной системы, из-за чего личинки становятся вялыми и иногда даже парализованными. По мере скопления жидкости внутри тела разрушению подвергаются внутренние органы и в первую очередь органы дыхания – дорсальные трахейные стволы, просвет которых уменьшается, что в конечном итоге приводит к смерти (Рис. 30.3).

Принято считать, что за развитие инфекционного процесса у личинок отвечают не только Vt-токсины, но и фосфоинозитид-специфические фосфолипазы С (PLC), хитиназы и металлопротеазы, а также, в случае попадания бактерии в гемолимфу, токсины, чей синтез кодируется плазмидными генами *vip* и *sip*. PLC и хитиназы оказывают разрушающее действие на перитрофические структуры, защищающие эпителий средней кишки от механических повреждений, а металлопротеазы, помимо этого, ещё способствуют снижению клеточного и гуморального иммунитета личинки, регулируют активность кристаллических токсинов и способствуют формированию биоплёнки. Причём интересно, что сверхэкспрессия гена, гомологичного гену *mogR* у *Listeria monocitogenes*, зависящая от фазы роста бактерии и, вероятно, чувства кворума (у *L. monocitogenes* зависит от температуры), приводит к потере жгутикового аппарата бактерии, способствуя образованию биоплёнки.

Погибшая личинка создаёт благоприятную среду для вегетатив-

Рис. 30.3. Компьютерная томография (саггитальный срез) ►
повреждений, возникающих у личинок жёлтолихорадочного комара (*Aedes aegypti*) спустя полчаса (b), час (c) и 6 часов (d) после заражения *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* в сравнении с контролем (a): Gc – желудочные слепые кишки, Vc – вакуоли, Fte – передний эпителий средней кишки, Fd – пища, Op – повреждения в эпителии средней кишки. Обратите внимание на образовавшиеся поперечные щели, указывающие на лизис клеток пищеварительного тракта, видимое округление брюшка и последующее разрешение внутренних органов (по Alba-Tercedor J., 2023)



ного роста *B. thuringiensis*, однако это не позволяет ему выйти из конкурентной борьбы с другими микроорганизмами за питательные вещества. Поэтому некоторые штаммы синтезируют бактериоцины (т. е. проявляющие антимикробные свойства вещества) *турицины*. В частности, *subsp. kurstaki* производит Bn1, подавляющий рост почвенных грамотрицательных фитопатогенных бактерий, таких как *Paucimonas lemoignei*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas savastanoi*, однако наибольшее влияние турицины всё же оказывают на грамположительные бактерии и собственно представителей *B. cereus* complex. Исследование¹ близлежащего пространства (филлосферы) стручкового перца (*Capsicum annuum*) до и после его обработки коммерческим препаратом, содержащим штамм *subsp. kurstaki*, показало существенное изменение видового состава почвенных бактерий. Если до обработки преобладали представители отдела Bacillota (ранее Firmicutes), то после обработки – отдела Gammaproteobacteria. В другом опыте² было показано, что *B. thuringiensis* способен замещать *Staphylococcus aureus* в составе биоплёнки. Причём делает он это весьма красиво. В процессе движения по матриксу со скоростью до 16 мкм/с «трение» жгутиков приводит к образованию пор, которые за 2–5 секунд «затягиваются» (Рис. 30.4), но этого времени оказывается вполне достаточно, чтобы в матрикс попал синтезируемый бактерией лизостафин, подавляющий рост *S. aureus*. Тогда на освободившемся пространстве *B. thuringiensis* формирует собственную биоплёнку. С другой стороны, он может вступать и в симбиотические взаимоотношения. В частности, сообщается³, что сокультивирование с *Rhizobium leguminosarum* не только не приводит к подавлению роста последнего, но и стимулирует образование клубеньков гороха и чечевицы.

Вместе с тем *B. thuringiensis* не единственный, кто может синтезировать вещества, подавляющие рост конкурентов. Так, синтезируемые *Pseudomonas fluorescens* бактериоцины затрудняют размно-

¹ Zhang B., Bai Z., et al. Assessing the impact of the biological control agent *Bacillus thuringiensis* on the indigenous microbial community within the pepper plant phyllosphere. FEMS Microbiol Lett. 2008; 284(1):102–108; DOI: 10.1111/j.1574–6968.2008.01178.x.

² Houry A., Gohar M., et al. Bacterial swimmers that infiltrate and take over the biofilm matrix. PNAS. 2012; 109(32):13088–13093; DOI: 10.1073/pnas.1200791109.

³ Mishra P. C., Mishra S., et al. Coinoculation of *Bacillus thuringiensis*-KR1 with *Rhizobium leguminosarum* enhances plant growth and nodulation of pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.). World J Microbiol Biotechnol. 2009; 25:753–761; DOI: 10.1007/s11274–009–9963-z.

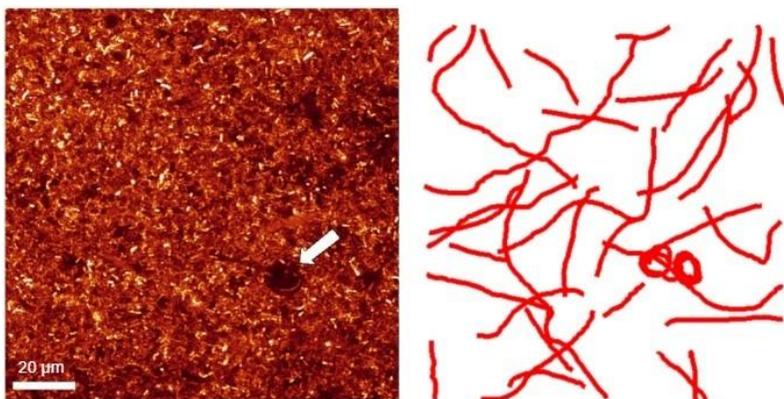


Рис. 30.4. Временная пора в матриксе (слева) и траектория движения (справа) *B. thuringiensis* по матриксу (по Houry A., 2012)

жение самого *B. thuringiensis* и способствуют его споруляции. В результате он сохраняется в виде споры и разносится различными животными (в отношении которых не проявляет активности), в частности, сельскохозяйственными животными, через их пищеварительный тракт, а также человеком через использование в сельском хозяйстве, занимая разнообразные ниши и в целом повторяя экологию *B. cereus* ss.

Март 1995 года^{1>}, Париж (Франция). В Военный учебный госпиталь Бежена (Hôpital d'instruction des armées Bégin) доставлен тяжело раненный взрывом наземной мины 28-летний солдат. Сразу после ранения, на поле боя, ему была проведена экстренная антибиотикотерапия (пенициллин G и метронидазол), после чего

¹ Hernandez E., Ramisse F., et al. *Bacillus thuringiensis* subsp. *konkukian* (serotype H34) superinfection: Case report and experimental evidence of pathogenicity in immunosuppressed mice. J Clin Microbiol. 1998; 36(7):2138–2139; DOI: 10.1128/jcm.36.7.2138–2139.1998.

его доставили в отделение неотложной помощи французского военного госпиталя в Сараево (Югославия, ныне – Босния и Герцеговина), где на фоне геморрагического шока, взрывной болезни лёгких, осколочных поражений левой ноги и множественных переломов левого колена ему была проведена операция. В течение 24 часов он был срочно доставлен в Париж.

На момент поступления обнаружено повышение температуры до 38,7 °С при нормальных значениях частоты сердечных сокращений, артериального давления и частоты дыхания. Анализ крови выявил лейкоцитоз (10,2 x 10⁹/л при норме 4–9 x 10⁹/л).

Микроскопическое исследование раневых тканей, полученных хирургическим путём (биопсии), выявило присутствие грамположительных палочек и спор, которые на кровяном агаре формировали белые крупные (5 мм) плоские колонии с шероховатыми краями и β-гемолизом. Биохимические тесты, проведённые с помощью анализаторов, дали противоречивый результат: *B. cereus* ss (API 50-CHB и 20-E) или *B. thuringiensis* (Vitek). С целью уточнения видовой принадлежности изолят направили в Отделение энтомопатогенных бактерий Института Пастера (Unité des Bactéries Entomopathogènes, Institute Pasteur), где его идентифицировали как *B. thuringiensis* subsp. *konkukian* (серотип H34⁽¹⁾).

Ввиду обнаружения устойчивости штамма к пенициллину и ампициллину антибиотикотерапия скорректирована на ципрофлоксацин и гентамицин, вводимые в течение 10 дней. В дальнейшем проведено несколько хирургических операций, и на 15-й день пациент выздоровел.

Приведённый случай, по-видимому, является первым сообщением, в котором *B. thuringiensis* фигурирует в качестве возможного этиологического агента инфекции человека. Как и в случаях инфицирования *B. cereus* ss, описанных в Главе 27, он оказался единственной бактерией, обнаруженной «на месте преступления». Однако в отличие от *B. cereus* ss *B. thuringiensis* всегда считался (и счи-

¹ Серотипирование по жгутиковым антигенам (H-антигенам) проводят методом агглютинации со специфическими диагностическими сыворотками к 79 сероварам *B. thuringiensis* (см. de Barjac H. *Identification of H-serotypes of Bacillus thuringiensis*, in *Microbial control of pests and plant diseases*. Ed.: H. D. Burges. London: The Academic Press Co., 1981, 949 p.).

тается) исключительно энтомопатогеном, безопасным для человека (подкожное введение мышам не приводит к гибели). В данном случае также задались вопросом, не является ли находка просто контаминантом, поскольку, как мы помним, пациент подвергся экстренной антибиотикотерапии, поэтому есть вероятность, что реальный «преступник» уже понёс своё наказание.

Чтобы расставить все точки над *i*, в том же госпитале на мышинной модели изучили возможность штамма вызывать кожную инфекцию. Для этого 5-недельным самкам на депилированный участок кожи (2 см²) наносили бактериальную суспензию, причём одной группе мышей за 4 дня до эксперимента проводили иммуносупрессию путём внутривенной инъекции циклофосфида (200 мг/кг массы тела). В результате кожное воспаление возникало при использовании концентрации не ниже 10⁷/мышь, правда у иммунокомпетентных мышей инфекционный процесс саморазрешался к 48-му часу. Патологоанатомическое исследование показало присутствие *B. thuringiensis* на внутренней стороне кожи только у мышей, подвергшихся иммуносупрессии, поэтому вполне вероятно, что заражение пациента произошло исключительно на фоне сильного повреждения тканей.

Дальнейшее изучение штамма показало отсутствие на его хромосоме и единственной плазмиде рVT9727 известных генов, кодирующих синтез Vt-токсинов, что, однако, не отрицает возможности присутствия кодирующих их пока ещё неизвестных генов, поскольку наличие параспорального тела подтвердили визуально в Институте Пастера с помощью окраски фиксированного мазка кумасси синим. Однако сложность этой методики заключается в плохой аффинности (т. е. сродстве) красителя, поэтому целесообразнее для визуализации параспоральных тел использовать¹ 0,1–1%-ный раствор кумасси бриллиантового синего G в 50%-ном растворе уксусной кислоты (как при окраске спор, см. Главу 21), который наносят на фиксированный мазок на полчаса, после чего промывают дистиллированной водой, высушивают и микроскопируют. В результате бактерии окрашиваются в светло-синий (голубой) цвет, а параспоральные тела – в тёмно-синий цвет (Рис. 31.1).

¹ Хлопова К. В., Горшков-Кантакузен В. А., и др. *К вопросу визуализации параспоральных тел и спор*. Международный вестник ветеринарии. 2025. 3:84-89; DOI: 10.52419/issn2072-2419.2025.3.84.

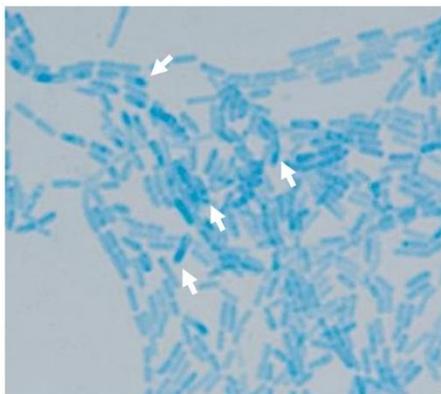


Рис. 31.1. Визуализация параспоральных тел *B. thuringiensis*; окраска кумасси синим

патологоанатомическом исследовании обнаруживается отёк мышечной ткани, гиперемия сосудов со стороны инъекции и значительное количество экссудата, вытекающего в момент разреза кожи (Рис. 31.2).

Интересно, что при культивировании споровой культуры в полужидком агаре (например, LB-агаре) обнаруживаются пузырьки газа (Рис. 31.3), в составе которого методом газовой хроматографии установлено присутствие CO_2 , что характерно для *Clostridium perfringens*, поскольку для представителей *B. cereus* complex характерно производство азота. И это вынуждает нас, во-первых, предполагать вклад газообразования в развитие отёков, о которых речь шла выше, поскольку у некоторых бактерий класса *Clostridia* встречается схожий механизм развития раневой инфекции, а, во-вторых, иными глазами взглянуть на сложности дифференцировки, о которых говорилось в Главах 16 и 27.

Конечно, кто-то может сказать, что опыты на мышах ещё не свидетельствуют о патогенности для человека. Однако уже сейчас имеются единичные сообщения о бактериемии, вызванной *B. thu-*

Вместе с тем исследователи изучили только потенциальную возможность *B. thuringiensis* вызывать кожную инфекцию, и в этой связи интересно посмотреть его потенциал как агента раневой инфекции¹. Для этого мышам внутримышечно (Рис. 22.2d) вводили споровую суспензию в концентрации 2×10^6 /мл, что приводило к развитию отёка, самопроизвольно спадающего к 3–6-м суткам. При

¹ Хлопова К. В., Горшков-Кантакузен В. А., и др. *B. thuringiensis* как возможный этиологический агент раневой инфекции, в сб. XIII сборник научных работ «Важнейшие вопросы инфекционных и паразитарных болезней», Тюмень: ФБУН ТНИИКИП Роспотребнадзора. 2025.



Рис. 31.2. Раневая инфекция у мыши, вызванная *B. thuringiensis* (эвтаназия на 2-е сутки; нижняя левая фотография прижизненная). Обратите внимание на воспаление в месте инъекции (чёрная стрелка), при вскрытии которого обнаруживаются гиперемия сосудов и отёк мышечной ткани, а также значительное количество экссудата, который вытекает в момент разреза кожи

ringiensis, у лиц, принимающих внутривенные наркотики^{<1>},⁽²⁾, а также о токсикоинфекции с рвотным и диарейным синдромом, вы-

¹ Kalinoski M. *Bacillus thuringiensis* bacteremia in an IV drug user. Am J Respir Crit Care Med. 2023; 207:A5336.

² Один случай наиболее показателен. В 2024 году 30-летний мужчина с анамнезом шизоаффективного расстройства, положительным результатом теста на антитела к гепатиту С, злоупотреблением комбинированными психоактивными веществами, внутривенным употреблением наркотиков и перенесённой спленэктомией (т. е. удаление селезёнки) обратился в отделение неотложной помощи Университетской больницы Статен-Айленда (Staten Island University Hospital), Нью-Йорк (США) с жалобами на лихорадку (38,3°C) и озноб. Других симптомов пациент не отмечал. Рентгенограмма грудной клетки не выявила отклонений. При осмотре выявлены двусторонние язвенные раны голени от внутривенных инъекций в этих областях,



Рис. 31.3. Газообразование в результате культивирования различных штаммов *B. thuringiensis*

званной употреблением в пищу купленного в магазине салата¹». Причиной последнего стало применение при выращивании овощей биопестицида на основе штамма *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* ABTS-1857 (обнаружен во всех образцах салата, отобранных из разных партий данного производителя). Последующее исследование штамма выявило присутствие хромосомных генов *cytK2* и *nheHbe*, которые, как мы помним, ответственны за синтез компонентов «диарейных» токсинов (гемолизина BL, негемолитического энтеротоксина и цитотоксина K). Плазмидный ген *ces*, ответственный за синтез «рвотного» токсина (цереулида), обнаружен не был, однако рвотный синдром у пострадавших присутствовал. В результате в 2016 году Европейское агентство по безопасности продуктов питания (European Food Safety Authority) призвало регулировать использование биопестицидов на основе *B. thuringiensis*, но до законодательного регулирования дело так и не дошло.

которые на рентгенограмме визуализированы как линейная металлическая плотность спереди от дистального вала левой малоберцовой кости, предположительно фрагмент иглы для инъекций (Рис. 31.4). Поскольку в анамнезе имеются эпизоды употребления инъекционных наркотиков, а симптомы указывают на развитие инфекционного процесса, осуществлён посев крови, однако пациент покинул отделение вопреки рекомендациям врача. Спустя 4 дня выросшая культура была идентифицирована как *B. thuringiensis*, ввиду чего пациент был повторно госпитализирован для проведения 7-дневного курса антибиотикотерапии (ванкомицин). Компьютерная томография подтвердила наличие иглы в нижних конечностях, ввиду чего пациенту предложена операция, от которой после совещания с семьёй он отказался из-за опасения, что необходимая пересадка кожи может оказаться неудачной, если продолжить внутривенное употребление наркотиков. Повторные посевы крови дали отрицательный результат, и ввиду улучшения состояния пациент выписался, отказавшись от психиатрической помощи (см. Barakat S., Kim H., et al. *Bacillus thuringiensis* bacteremia in a 30-year-old Intravenous drug user: a report of a rare case. *Cureus*. 2024; 16(10):e71704; DOI: 10.7759/cureus.71704).

¹ EFSA BIOHAZ Panel. *Risks for public health related to the presence of Bacillus cereus and other Bacillus spp. including Bacillus thuringiensis in foodstuffs*. EFSA J. 2016; 14:4524; DOI: 10.2903/j.efsa.2016.4524.

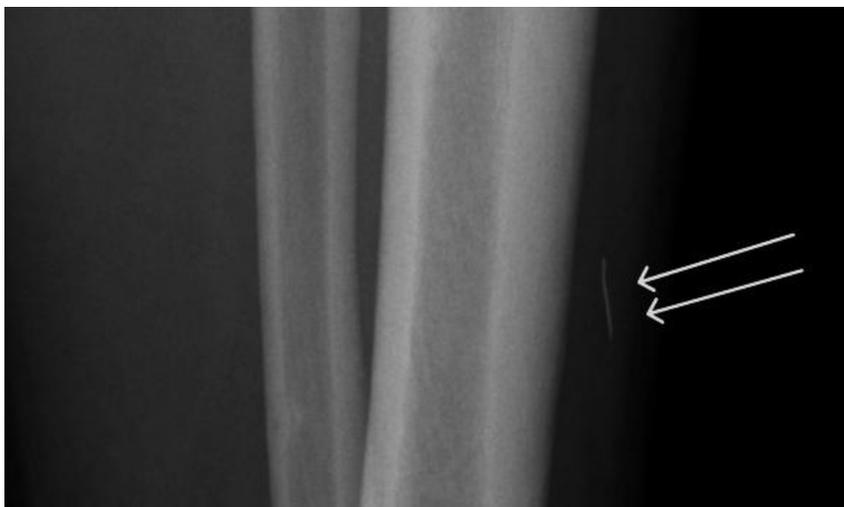


Рис. 31.4. Рентгенограмма, на которой обнаруживается инородное тело (белые стрелки), впоследствии оказавшееся иглой для инъекций

Тем не менее исследование¹ различных штаммов *B. thuringiensis* показывает присутствие в их геноме генов «диарейных» и «рвотных» токсинов, функциональность которых, как и в случае *B. cereus* ss, доказывается на биопробных животных. Таким образом, можно заключить, что существующий на сегодняшний день протокол исследования патогенности штамма, заключающийся в подкожном (внутрибрюшинном) заражении биопробного животного, не всегда подходит, поэтому требуется создание новых методик и четкий контроль за приобретением бактериями новых генов. Конечно, скорее всего «диарейные» штаммы *B. thuringiensis* существовали и раньше (напомним, что эти токсины кодируются хромосомными генами), но их просто считали контаминантами, а отравление относили к «неясной этиологии». Однако, как Вы уже могли убедиться, мы живём в уникальное время, вероятно, нового эволюционного витка *B. cereus* complex, сопровождающегося обменом генов между его представителями, и переосмысления ролей их всех. Сибиряз-

¹ Хлопова К. В., Горшков-Кантакузен В. А., и др. Токсичные штаммы *Bacillus thuringiensis*, в *Эпидемиология-2025: сборник тезисов Конгресса с международным участием (Москва, 15–16 октября 2025 года)*, под ред. акад. РАН В. Г. Акимкина, М.: ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. С. 174–175.

венный микроб долгие годы был главным представителем этой «семьи», но теперь его место постепенно вытесняет *B. cereus* ss с рХО-подобными плазмидами. Поэтому кто знает, какие ещё сюрпризы в будущем нам преподнесёт постепенно выходящий на «арену» *B. thuringiensis*.

Раздел V

Иные представители
Bacillus cereus complex

К настоящему моменту мы познакомились с основными представителями *B. cereus* complex, а именно *B. anthracis*, *B. cereus* ss и *B. thuringiensis*, а также поговорили о *B. tropicus*, *B. shinchuchen* и *B. cytotoxicus*. Теперь же настало время обсудить остальных представителей группы. Конечно, из Главы 4 мы помним, что существуют различные подходы к тому, кого считать представителем («членом комплекса»), поэтому рассмотрим только тех, на ком сходятся все исследователи.

В 1886 году Карл Флюгге¹ описал^{<2>} бактерию, образующую на плотных питательных средах волокнистые колонии в виде закрученных нитей (ризоидов), напоминающих грибной мицелий, из-за чего дал ей название *грибовидная палочка* или *Bacillus mycoides*. Такой характерный тип колоний обусловлен особенностями деления неподвижных бактериальных клеток. Изначально они делятся линейно в обе стороны, однако затем на одном из концов деление происходит под углом, ввиду чего цепочка начинает загибаться и в конечном итоге замыкается в круг. Затем некоторые клетки цепочки, именуемые *точками ветвления*, формируют дочерние клетки, от которых берут своё начало боковые цепочки так же, как и материнская, замыкающиеся в круг. От каждой боковой цепочки происходят ещё боковые цепочки и так далее (**Рис. 32.1**). Таким образом, формируется колония, захватывающая большие пространства в поисках питательных веществ. Интересно, что в ответ на сжатие среды ветвление продолжается перпендикулярно силе сжатия, а при растяжении – параллельно. При наличии изгиба (лунки в питательной среде) колония растёт спиралевидно, а при возникновении препятствия как бы обволакивает его (**Рис. 32.2**).

Вместе с тем всё это относится исключительно к диким штаммам, поскольку при последовательных пассажах клетка, являющая-

¹ Carl Georg Friedrich Wilhelm Flügge, 1847–1923; германский врач, бактериолог, гигиенист. Автор теории воздушно-капельной передачи туберкулёза. Ректор Университета Бреслау (1900–1901).

² Flügge C. *Die Mikroorganismen: mit besonderer Berücksichtigung der Ätiologie der Infektionskrankheiten*, Leipzig, 1886, 692 p.

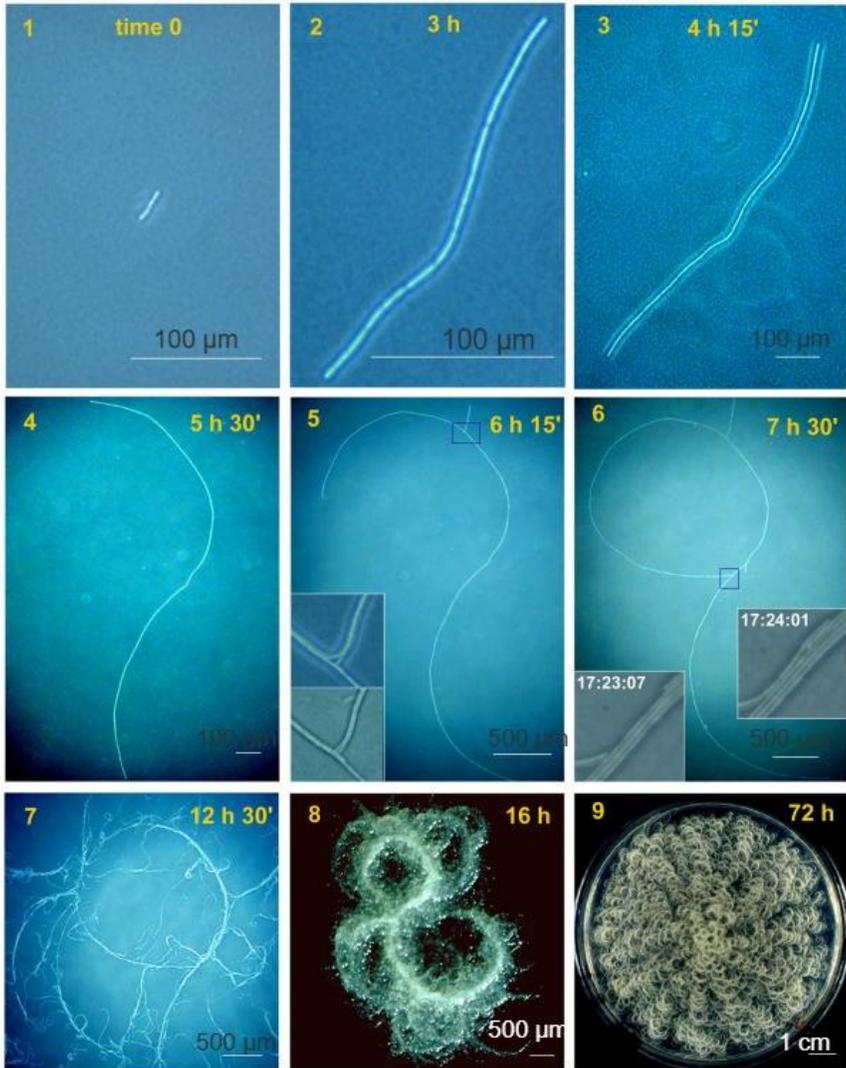


Рис. 32.1. Процесс формирования колоний *B. thuringiensis*. Можно видеть, как в процессе деления клеток образуется нить (1), которая постепенно изгибается за счёт углового деления концевых клеток (3 и 4), что к 5-му часу инкубирования приводит к заметному изгибу нити (4). Далее происходит первое боковое разветвление (5 и 7) нити, повторяющее уже описанный сценарий, а основная нить замыкается в круг (6). К 12-му часу появляется множество боковых нитей, также стремящихся к закруглению (8), что в конечном счёте приводит к формированию колонии (9) с характерным узором (по Di Franco C., 2002)

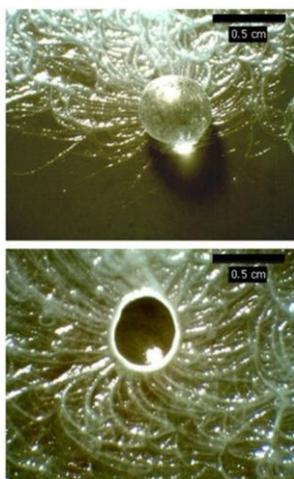


Рис. 32.2. Изменение морфологии колонии *B. mycooides* под действием стеклянного шарика диаметром 5 мм (no Stratford J. P., 2013)



Рис. 32.3. Колония (в центре) штамма *B. mycooides* SIN96 и её ватообразные (3–6) и круглые (1, 2) мутанты (no Di Franco C., 2002)

ся точкой ветвления, уже не формирует дочернюю клетку (боковую ветвь), а «выбивается» из цепочки и продолжает расти параллельно основной цепочке. В результате формируются дефектные колонии: от ватообразной до круглой в зависимости от количества пассажей (**Рис. 32.3**).

B. mycooides распространён повсеместно. В почве он подавляет рост фитопатогенных бактерий и грибов, способствуя росту растений. В частности, штамм *B. mycooides* b12.3, выделенный¹ из почвы острова Ольхон, расположенного на озере Байкал (Россия), способен подавлять рост бактерий *Xanthomonas campestris*, *Clavibacter michiganensis* и *Pectobacterium atropsecticum*, а также гриба *Alternaria solani*. Примечательно, что в геноме штамма были также обнаружены гены, кодирующие инсектицидные токсины Arr4Aa1, Trp78Ba1 и Spr1Aa1, то есть те самые кристаллические токсины, свойствен-

¹ Romanenko M. N., Shikov A. E., et al. *Genomic insights into the bactericidal and fungicidal potential of Bacillus mycooides b12.3 isolated in the Soil of Olkhon Island in Lake Baikal, Russia*. Microorganisms 2024; 12(12):2450; DOI: 10.3390/microorganisms12122450.

ные штаммам *B. thuringiensis*. Они встречаются и у других штаммов *B. mycoides*, ввиду чего, как мы помним из Главы 4, штаммы относят к биовару *Thuringiensis*, однако считается^{1>}, что эти гены не стабильный признак, а приобретаются путём горизонтального переноса.

Штаммы, обитающие в воде, чаще всего выступают в качестве патогена рыб, вызывая различные поражения (Рис. 32.4), в частности, гниение жабр у обыкновенных карпов (*Cyprinus carpio*), язвы кожи у большеротого окуня (*Micropterus salmoides*), некроз мышц у канального сомика (*Ictalurus punctatus*) и повреждения пищевода у сибирского осетра (*Acipenser baeri*). При этом выделенные от рыб изоляты часто оказываются резистентными к действию антибиотиков. Однако это не единственные организмы, с которыми взаимодействует бактерия. Так, штамм *B. mycoides* BS2–15, выделенный^{2>} из донных отложений озера Байкал, проявляет альгицидные свойства по отношению к произрастающим там диатомовым водорослям



Рис. 32.4. Язва у большеротого окуня (*Micropterus salmoides*), вызванная штаммом *B. mycoides* LYS1 (по Cao H., 2018)

Ulnaria acus, подавляя их рост и увеличивая хрупкость фрустулы (т. е. клеточной стенки, состоящей из кремнезёма, своеобразного панциря), за счёт разрушения клеточного ядра и накопления липидов, хотя до конца этот механизм не ясен.

Принято считать, что *B. mycoides* не вызывает заболева-

¹ Méric G., Mageiros L., et al. Lineage-specific plasmid acquisition and the evolution of specialized pathogens in *Bacillus thuringiensis* and the *Bacillus cereus* group. *Mol Ecol.* 2018; 27(7):1524–1540; DOI: 10.1111/mec.14546.

² Bedoshvili Y., Bayramova E., et al. Impact of algicidal *Bacillus mycoides* on diatom *Ulnaria acus* from Lake Baikal. *Diversity.* 2021; 13(10):469; DOI: 10.3390/d13100469.

ний человека. Тем не менее сообщается^{<1>} о его выделении из крови 65-летнего мужчины, госпитализированного в Медицинский центр Телгрои (Telgroot MC) в Хилверсуме, Нидерланды, в связи с гипоксической остановкой сердца, вызванной гриппом А. Конечно, эта находка отличается от тех, которые нам встретились в Главе 27, поскольку в данном случае отсутствовали признаки бактериемии, а проникновение в кровоток, скорее всего, произошло с колонизированной кожи во время установки катетера (что само по себе тоже опасно), однако этот случай наглядно показывает потенциальную способность *B. mycoides* выживать в организме человека. И это особенно важно ввиду наличия некоторых хромосомных генов, кодирующих компоненты «диарейных» токсинов, поскольку бактерия ещё и выступает контаминантом продуктов питания.

Изначально вид *B. mycoides* подразделялся на *sensu stricto* (в узком смысле) и неклассифицированный таксон, выделенный^{<2>} в 1998 году в самостоятельный вид *B. pseudomycoides* с типовым штаммом NRRL B-617^T. Как и ближайший родственник, этот вид способствует росту растений. В частности, выделяемые во время образования биоплёнки летучие соединения 2,6-дитретбутилциклогекса-2,5-диен-1,4-дион и 3,5-дитретбутилфенол подавляют ген MYB пшеницы летней (*Triticum aestivum*), сверхэкспрессия которого снижает устойчивость к засухе, то есть присутствие бактерии стимулирует засухоустойчивость растения. При этом экспериментально было показано^{<3>}, что обработка семян *B. pseudomycoides* увеличивает всхожесть на 20 %.

С другой стороны, бактерия способна влиять на рост растений и путём повышения биодоступности микроэлементов в почве. Так, недавно выделенный^{<4>} из богатой селеном почвы штамм SA14 демонстрирует способность восстанавливать Se^{IV} до Se⁰, тем самым

¹ Heidt J., Papaloukas N., et al. *A rare bloodstream infection: Bacillus mycoides*. Neth J Med. 2019; 77(6):227–230.

² Nakamura L. K. *Bacillus pseudomycoides* sp. nov. Int J Syst Bacteriol. 1998; 48(3):1031–5; DOI: 10.1099/00207713-48-3-10.

³ Paul G. K., Mahmud S., et al. *Volatile compounds of Bacillus pseudomycoides induce growth and drought tolerance in wheat (Triticum aestivum L.)*. Sci Rep. 2022; 12(1):19137; DOI: 10.1038/s41598-022-22354-2.

⁴ Huang X., Wang Y., et al. *A novel selenite-reducing bacterium Bacillus pseudomycoides SA14 isolated from Se-enriched soil and its potential Se biofortification on Brassica chinensis L.* J Earth Sci. 2025; 36:1756–1765; DOI: 10.1007/s12583-022-1676-3.

повышая биодоступность данного элемента в почве и, как следствие, его концентрацию в китайской черешковой капусте (*Brassica chinensis*).

Аналогичные свойства проявляют и штаммы вида *Bacillus paramicroides*. В частности, штамм PM51 способен^{<1>} адсорбировать ионы кадмия, тем самым повышая всхожесть семян льна (*Linum usitatissimum*), а штамм 24522 – восстанавливать водорастворимые ионы SeO_4^{2-} и SeO_3^{2-} , попадающие в водные источники в результате вулканической и горнодобывающей деятельности и пагубно влияющие на фауну, в частности, рыб и креветок^{<2>}. Не менее интересной является и способность некоторых штаммов к биодegradации. Так, штамм NDZ способен разлагать опасный для человека инсектицид ацефат^{<3>}, штамм TW-2 – полиэтиленовую плёнку^{<4>}, а штамм YC02 – мочевую кислоту^{<5>}. Примечательно, что последний даже рассматривается в качестве потенциального средства для предотвращения подагры.

Находят штаммы *B. paramicroides* применение и в качестве пробиотиков. Например, штаммы, выделенные^{<6>} от диких рыб вида *Channa*, применяются в качестве кормовой добавки, поскольку способны подавлять рост *Aeromonas hydrophila* – причины септицемии у индийских карпов *Labeo rohita*.

Поиск новых пробиотиков для сельскохозяйственных животных привёл к выделению в 1966 году штамма, идентифицированного как *B. cereus* var. *toyoi* и вошедшего в состав препарата

¹ Zainab N., Glick B. R., et al. Deciphering the mechanistic role of *Bacillus paramicroides* (PM51) and *Bacillus tequilensis* (PM52) in bio-sorption and phyto-assimilation of Cadmium via *Linum usitatissimum* L. Seedlings. *Plant Physiol Biochem.* 2024; 211:108652; DOI: 10.1016/j.plaphy.2024.108652.

² Liu P., Long H., et al. Highly-efficient synthesis of biogenic selenium nanoparticles by *Bacillus paramicroides* and their antibacterial and antioxidant activities. *Front Bioeng Biotechnol.* 2023; 11:1227619; DOI: 10.3389/fbioe.2023.1227619.

³ Ren J., Wang C., et al. Biodegradation of acephate by *Bacillus paramicroides* NDZ and its degradation pathway. *World J Microbiol Biotechnol.* 2020; 36:155; DOI: 10.1007/s11274-020-02931-1.

⁴ Wu H., Liu Q., et al. Biodegradability of polyethylene mulch film by *Bacillus paramicroides*. *Chemosphere.* 2023; 311(2):136978; DOI: 0.1016/j.chemosphere.2022.136978.

⁵ Cao X., Cai J., et al. Biodegradation of uric acid by *Bacillus paramicroides*-YC02. *Microorganisms.* 2023; 11(8):1989; DOI: 10.3390/microorganisms11081989.

⁶ Yousif S., Jamal M. T., et al. Evaluation of *Bacillus paramicroides* strains isolated from *Channa* fish sp. on growth performance of *Labeo rohita* fingerlings challenged by fish pathogen *Aeromonas hydrophila* MTCC 12301. *Microorganisms.* 2023; 11(4):842; DOI: 10.3390/microorganisms11040842.

TOYOCERIN® в качестве активного ингредиента. Последующее исследование^{<1>} штамма (BCT-7112^T) выявило две особенности: во-первых, выделенный штамм относится к новому виду *Bacillus toyonensis*, а, во-вторых, он проявляет устойчивость к хлорамфениколу и тетрациклину. Причиной последнего является наличие генов *tetM* и *catQ*, широко распространённых среди членов *B. cereus* complex и имеющих древнее происхождение. Однако подавляющее большинство штаммов вида, включая близкородственные штаммы Rock1–3 и Rock3–28, не проявляют устойчивости, поскольку, несмотря на функциональную активность генов, их промоторы (т. е. «стартовые площадки») относительно слабы.

Несмотря на повсеместное использование штаммов *B. toyonensis* в составе пробиотических препаратов для сельскохозяйственных животных, а также рыб, последние исследования вынуждают насторожиться. Например, в геноме уже упомянутого штамма BCT-7112^T обнаружены² гены, кодирующие синтез «диарейных» токсинов. Однако синтезируемого токсина так мало, что, как считается, он не способен привести к развитию «диарейного» синдрома. С другой стороны, в геноме штамма IP5832, входящего в состав препарата «Бактисубтил®», обнаружены^{<3>} уже не только гены, кодирующие «диарейные» токсины, но и гены, кодирующие синтез протеолитических ферментов и фосфолипазы С с различной специфичностью. Кроме того, штамм оказался устойчивым к тетрациклину, хлорамфениколу, эритромицину и канамицину. Примечательно, что до 19 февраля 2020 года в России данный препарат использовался для лечения дисбактериоза и острых кишечных ин-

¹ Jiménez G., Urdiain M., et al. *Description of Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. *Syst Appl Microbiol.* 2013; 36(6):383–391; DOI: 10.1016/j.syapm.2013.04.008

² Abdulmajjood A., Herrmann J., et al. *Evaluation of enterotoxin gene expression and enterotoxin production capacity of the probiotic strain Bacillus toyonensis BCT-7112^T*. *PLoS One.* 2019; 14(4):e0214536; DOI: 10.1371/journal.pone.0214536.

³ Kazantseva O. A., Kulyabin V. A., et al. *The genome sequence of Bacillus toyonensis strain IP 5832 isolated from the probiotic “Bactisubtil®” contains genes of Bacillus cereus pathogenicity factors and antibiotic resistance*. *Microbiology.* 2024; 93:973–981; DOI: 10.1134/S0026261724606870.

фекций у лиц старше 7 лет и согласно инструкции включал штамм *B. cereus* IP 5832¹.

Определённый интерес представляет штамм P18, выделенный² из морских глубин, поскольку помимо факторов патогенности он несёт гены, кодирующие формирование жгутиков и синтез капсулы. В результате штамм оказывает сильное цитопатическое действие на клетки рыб и млекопитающих, а в эксперименте на лабораторных животных приводит к летальному исходу у рыб (при внутримышечном заражении) и у мышей (при внутрибрюшинном заражении). При патологоанатомическом исследовании обнаружены повреждения почек, селезёнки и кишечника (**Рис. 32.5**). Вместе с тем штамм Cbmb3, выделенный³ из почвы, способен разлагать поливинилхлорид, используя его в качестве единственного источника углерода, а также стимулировать рост растений.

Столь крайний дуализм свойственен не только штаммам *B. toyonensis*. Вспомните штаммы *B. tropicus*, вызывающие инфекционный процесс у китайских триониксов (Глава 9) или больших рыжих кенгуру (Глава 16). Но другие штаммы этого вида, наоборот, применяются при производстве так называемых самовосстанавливающихся бетонов из-за способности производить кальцит, «заци-

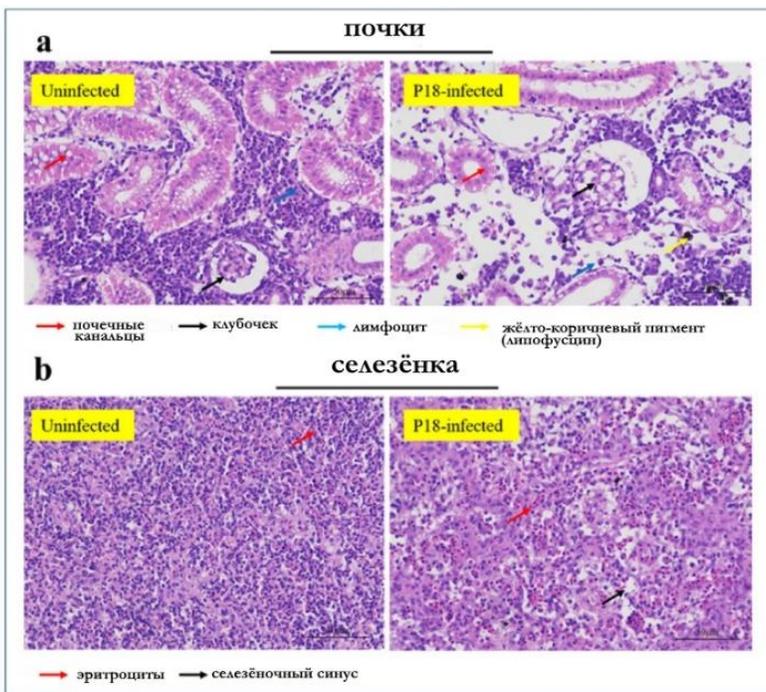
Рис. 32.5. Поражения почек, печени и кишечника у рыбы (А) и мыши (В) ► в результате заражения *B. toyonensis* P18 (справа) в сравнении с контролем (слева) в течение 6 (В) и 48 (А) часов. Можно видеть, что у японской камбалы почечные каналцы стали более рыхлыми, а количество лимфоцитов в мезенхиме резко снизилось. В селезёнке наблюдается значительное снижение количества иммунных клеток в белой пульпе и мезенхиме, сопровождавшееся небольшим расширением селезёночного синуса. У мыши в почках наблюдалось сужение почечной капсулы и кровоизлияние, а в кишечнике – отслоение эпителиальных клеток и гиперемия кровеносных сосудов (по Luo J.-C., 2021)

¹ Решение об отмене государственной регистрации лекарственного препарата и исключении его из государственного реестра лекарственных средств от 19.02.2020 № 20–3/224. Основание: заявление уполномоченного представителя производителя.

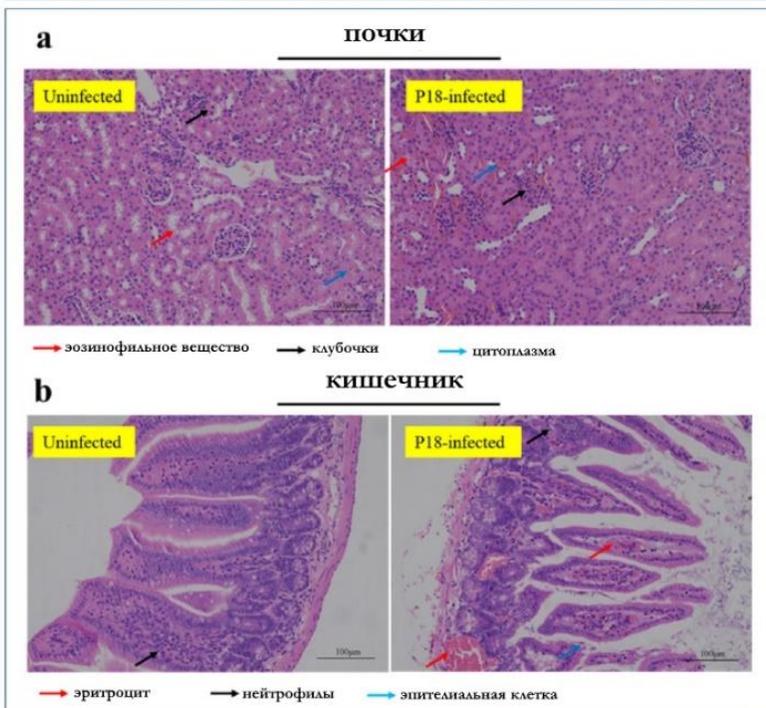
² Luo J.-C., Long H., et al. *Characterization of a Deep Sea Bacillus toyonensis isolate: genomic and pathogenic features*. Front Cell Infect Microbiol. 2021; 11:629116; DOI: 10.3389/fcimb.2021.629116.

³ Wang D., Yu H., et al. *The complete genome sequence of Bacillus toyonensis Cbmb3 with polyvinyl chloride-degrading properties*. J Xenobiot. 2024; 14(1):295–307; DOI: 10.3390/jox14010018.

A



B



вляющий» возникающие микротрещины^{1>}, а также способны разлагать полиэтилен^{2>}. Как и некоторые штаммы *B. cereus*, *B. pseudomicroides* и *B. paramicroides*, штамм YJ33 препятствует засолению почв и способствует увеличению биомассы и питательной ценности люцерны посевной (*Medicago sativa*)^{3 >}, а штамм CH13, подобно *B. thuringiensis* и *B. mycoides*, эффективно ингибирует фитопатогенные грибы *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia* sp., *Rhizoctonia solani* и *Alternaria alternata* при обработке им семян различных видов перца чили (*Capsicum annuum*, *Capsicum pubescens* и *Capsicum chinense*)^{4>}.

Таким образом, можно видеть, что рассмотренные виды занимают примерно одинаковые биологические ниши, и их свойства весьма схожи. Они обнаруживаются в самых суровых условиях, приобретая в них новые способности, одни из которых полезны, а другие, напротив, смертельны для тех или иных видов. Так или иначе, они пока не представляют опасности для человека и млекопитающих, но наличие общих хромосомных генов, кодирующих токсины, а также активный обмен генами вынуждает насторожиться. Как уже не раз говорилось, мы живём, вероятно, в уникальное время нового эволюционного витка *B. cereus* complex, а также нового понимания «близости» входящих в него видов.

Это та мистерия, то мистическое таинство, пока ещё малопонятное, но к которому мы постепенно становимся причастными. Это та история, в которой много вопросов, и ответы на них ещё впереди.

¹ Rajesh A., Hariny V. S., et al. Performance of *Bacillus tropicus* on mechanical, durable and crack remediation properties in sustainable vermiculite concrete. J Bionic Eng. 2024; 21:1987–1999; DOI: 10.1007/s42235-024-00546-y.

² Isha, Ali S., et al. Biodegradation of polyethylene using *Bacillus tropicus* isolated from sewage wastewater treatment plant. Processes. 2024; 12(11):2516; DOI: 10.3390/pr12112516; Samanta S., Datta D., et al. Biodegradation efficacy of soil inherent novel sp. *Bacillus tropicus* (MK318648) onto low density polyethylene matrix. J Polym Res. 2020; 27:324; DOI: 10.1007/s10965-020-02296-x.

³ Li J., Che Y., et al. *Bacillus tropicus* YJ33 and *Medicago sativa* L. synergistically enhance soil aggregate stability in saline-alkali environments. Microorganisms. 2025; 13(6):1291; DOI: 10.3390/microorganisms13061291.

⁴ Bernal M. A. E., Navarro M. P. M., et al. Biocontrol activity of *Bacillus altitudinis* CH05 and *Bacillus tropicus* CH13 isolated from *Capsicum annuum* L. seeds against fungal strains. Microorganisms. 2024; 12(10):1943; DOI: 10.3390/microorganisms12101943.

Всё тот же холодный вечер. Но только спустя тысячи лет, как и тот юноша, мы всё ещё блуждаем в тёмном лесу неведения. И только совместными усилиями, противостоя прорастающим в душах людей семенам злобы, у нас есть шанс дойти до заветного костра с ответами, где под бескрайним простором звёзд покоятся вечные тайны Вселенной.

Приложение

Прописи (рецептуры) некоторых питательных сред, применяемых для работы

Сывороточный агар

Смешать 4 объёма нормальной лошадиной сыворотки, нагретой до 50–60 °С, с одним объёмом расплавленного питательного агара (3%-ный агар на основе триптического гидролизата мяса – переваре Хоттингера, общий азот 130–250 мг/%, рН 7,2–7,3). Смесь сразу разлить по чашкам слоем примерно 3–4 мм.

Бикарбонатный агар

Смешать 25 мл 5%-ного раствора гидрокарбоната натрия с 75 мл расплавленного питательного агара (3%-ный агар на основе триптического гидролизата мяса – переваре Хоттингера, общий азот 130–250 мг/%, рН 7,2–7,3). Смесь сразу разлить по чашкам слоем примерно 3–4 мм.

Бикарбонатно-сывороточный агар (по Green)

Смешать бикарбонатный агар и сывороточный агар в соотношении 1 : 10.

Двухслойный агар (для определения гемолитической и протеолитической активности)

Разлить в чашки по 20 мл 1%-го агара Difco на физиологическом растворе. После остывания наслоить 0,7%-ный агар на физиологическом растворе, в который внесены 6 % трижды стерильно отмытых в физиологическом растворе эритроцитов барана (для определения гемолитической активности) или желатин, казеин, бычий сывороточный альбумин и гемоглобин в концентрации 0,4 % (для определения протеолитической активности).

Среда ГКИ (Государственный контрольный институт)

Смешать 60 мл раствора Хенкса и 40 мл бычьей сыворотки, инактивированной при 56 °С в течение получаса. Тщательно перемешать и довести до рН 7,2 с помощью бикарбоната натрия. Стерильно разлить по 2 мл в пробирки и закрыть резиновыми пробками. Хранить при 4 °С.

Желточный агар

К 100 мл расплавленного и охлаждённого до 45 °С агара Хоттингера добавить 5–10 мл желтка куриного яйца, предварительно разведённого физиологическим раствором в соотношении 2 : 3. Тщательно перемешать и разлить по чашкам.

Жидкая желточная среда Дрожжевиной

Смешать куриный желток с физиологическим раствором в соотношении 1 : 9. Разлить по пробиркам. Не стерилизовать! (Для проверки на стерильность поместить на 2 суток при 37 °С.)

Кровяной агар

Кровь барана, взятую из яремной вены, собрать в дефибринатор (флакон со стеклянными бусами) при постоянном круговом покачивании примерно 15–20 минут. После окончания формирования на бусах плотного сгустка фибрина отфильтровать кровь через марлевую салфетку. Добавить полученную дефибрированную кровь в количестве 3–5 % в расплавленный и остуженный до 45 °С агар Хоттингера, после чего незамедлительно разлить по чашкам.

Минимальная среда «9АТ»

В 1000 мл дистиллированной воды растворить 13 г агара-агара (Difco); 4,5 г тригидрата дикалийфосфата; 0,5 г монокалийфосфата; 2 г сульфата аммония; 0,025 г гептагидрата сульфата магния; 0,015 г моногидрата сульфата марганца (II); 0,015 г гептагидрата сульфата железа (II); 0,05 г дигидрата хлорида кальция; 0,5 г тригидрата цитрата натрия; 4 г d-глюкозы; 0,2 г l-аланина; 0,2 г l-гистидина; 0,2 г l-глутаминовой кислоты; 0,02 г глицина; 0,2 г l-лизина; 0,2 г l-метионина; 0,2 г l-пролина; 0,2 г l-серина; 0,2 г l-треонина и 0,001 г тиамина.

Среда «СОПЭК»

В 425 мл дистиллированной воды растворить 0,035 г l-аланина; 0,2 г гидрохлорида l-аргинина; 0,25 г l-аспарагиновой кислоты; 0,24 г l-валина; 0,074 г гидрохлорида l-гистидина; 0,09 г глицина; 0,82 г l-глутамата натрия; 0,23 г l-изолейцина; 0,3 г l-лейцина; 0,3 г l-лизина; 0,1 г l-метионина; 0,06 г l-пролина; 0,31 г l-серина; 0,16 г l-треонина; 0,2 г l-тирозина; 0,47 г l-триптофана; 0,17 г l-фенилаланина; 0,034 г l-цистина; 0,003 г аденина; 0,002 г урацила; 0,001 г гидрохлорида тиамина; 0,008 г хлорида кальция; 0,026 г гептагидрата сульфата магния; 0,002 г моногидрата сульфата марганца (II); 0,002 г моногидрата сульфата железа (II); 3,92 г тригидрата дикалийфосфата; 8 г гидрокарбоната натрия; 2,5 г d(+) глюкозы. Полученный раствор стерилизовать фильтрацией через мембранный фильтр и добавить вместе с 75 мл противосибиреязвенного глобулина, предварительно нагретыми до 50 °С, к подогретой до 50 °С смеси из 15 г расплавленной агарозы в 500 мл дистиллированной воды, стерилизованной автоклавированием при 121 °С в течение 20 минут. Хорошо перемешать и разлить в чашки по 10–12 мл.

Голодный агар

В 1000 мл дистиллированной воды растворить 15 г агара, 5 г пептона, 5 г хлорида натрия и 2,5 г дрожжевого экстракта.

Список литературы

1. Абрамова Ф. А., Гринберг Л. М. Патологическая анатомия сибиреязвенного сепсиса по материалам инфекционной вспышки 1979 г. в Свердловске (некоторые вопросы морфо-, пато- и танатогенеза). Архив патологии. 1993; 1:23–26.
2. Артемьева Е. А., Мельникова Л. А. и др. Испытание «Набора определения титра антител в сыворотке крупного рогатого скота, вакцинированного против сибирской язвы в РНГА» на соответствие техническим условиям. Ветеринарный врач. 2020; 6:5–11; DOI: 10.33632/1998–698X.2020–6–5–11.
3. Балезина Т. И. К истории открытия отечественного пенициллина. Антибиотики и химиотерапия. 1994; 39(1):29–32.
4. Барков А. М., Баркова И. А., и др. Обнаружение антител к протективному антигену *Bacillus anthracis* с использованием реакции непрямой гемагглютинации и твердофазного иммуноферментного метода. Проблемы особо опасных инфекций. 2010; 3(105):42–45; DOI: 10.21055/0370–1069–2010–3(105)–42–45.
5. Брюхова Д. Д., Дубровина В. И., и др. Патологоанатомическая картина поражения головного мозга у белых мышей при экспериментальной сибиреязвенной инфекции. Acta Biomedica Scientifica. 2020; 5(1):65–71; DOI: 10.29413/ABS.2020–5.1.9.
6. Буравцева Н. П., Аксёнова Л. Ю., и др. Методические подходы при определении чувствительности *Bacillus anthracis* к антибактериальным препаратам. Антибиотики и химиотерапия. 2009; 54(3–4):6–10.
7. Вашков В. И. Основные вопросы научно-исследовательской работы в области дезинфекции. Гигиена и санитария. 1953; 9:39–43.
8. Ветеринарные правила осуществления профилактических, диагностических, лечебных, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов сибирской язвы, утв. Приказом Министерства сельского хозяйства Российской Федерации от 23 сентября 2021 г. № 648.
9. Ветеринарные правила содержания, эксплуатации и ликвидации скотомогильников, утв. Приказом Минсельхоза России от 11 ноября 2024 г. № 674.
10. Гефен Н. Е., Шустиков В. М., и др. Изучение реактогенности, безвредности и иммунологической эффективности аэрозольного метода иммунизации против сибирской язвы при испытаниях на людях. Журнал микробиологии. 1970; 12:81–85.
11. Гинсбург Н. Н. Сибиреязвенная вакцина СТИ, в Сборник работ НИИЭГ Красной Армии. Выпуск I. М., 1946.
12. Гинсбург Н. Н. Сибиреязвенная вакцина СТИ, в Сборник работ НИИЭГ Красной Армии. Выпуск I. М., 1946, стр. 5–90.
13. Гончарова Ю. О., Бахтеева И. В., и др. Мультилокусное сиквенс-типирование штаммов сибиреязвенного микроба, выделенных на территории России и сопредельных государств. Проблемы особо опасных инфекций. 2021; 1:95–102; DOI: 10.21055/0370–1069–2021–1–95–102.
14. Горшков-Кантакузен В. А. Врач Китасато Сибасабуру: достижения и посмертное почитание в синтоизме. Японские исследования. 2024; 3:86–97; DOI: 10.55105/2500–2872–2024–2–86–97.

15. Горшков-Кантакузен В. А. *Опера о чуме: учебник*, М.: Издательство Московского университета, 2024, 616 с.
16. Домарадский И. В. *Перевёртыши (рассказ «неудобного человека»)*. М.: [б. и.], 1995, 176 с.
17. Дугаржапова З. Ф., Чеснокова М. В., и др. *Совершенствование методических подходов к обследованию сибирязвенных захоронений и скотомогильников*. Проблемы особо опасных инфекций. 2019; 4:41–47; DOI: 10.21055/0370-1069-2019-4-41-47.
18. Еременко Е. И. *Группа бактерий *Bacillus cereus* – проблемы идентификации и таксономии*. Медицинский вестник Северного Кавказа. 2008; 3:57–60.
19. Ермольева З. В. *Пенициллин.*, М.: Наркомздрав, Гос. изд-во мед. лит., Медгиз, 1946, 153 с.
20. Жолдошев С. Т. *Особенности клинического течения сибирской язвы в современных условиях*. Проблемы особо опасных инфекций. 2011; 4(110):85–87; DOI: 10.21055/0370-1069-2011-4(110)-85-87.
21. Жолдошев С. Т. *Случай кишечной формы сибирской язвы*. Журнал инфектологии. 2011; 3(3):111–113; DOI: 10.22625/2072-6732-2011-3-3-111-113.
22. *Инфекционные болезни: национальное руководство, под ред. Н. Д. Ющука, Ю. Я. Венгерова*, 3-е изд., перераб. и доп., Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2021, 1104 с.
23. Картавая С. А., Симонова Е. Г., и др. *Научное обоснование размеров санитарно-защитных зон сибирязвенных захоронений на основе комплексной оценки риска*. Гигиена и санитария. 2016; 95(7):601–606; DOI: 10.18821/0016-9900-2016-95-7-601-606.
24. Ковалёв Ю. Н., Кисличкина О. И., и др. *Генетические основы создания бивалентной рекомбинантной вакцины против чумы и сибирской язвы*, в сб. *Актуальные вопросы профилактики особо опасных инфекционных заболеваний*. Киров, 1991, 214–215 с.
25. Колесникова О. Б., Загоскина Т. Ю., и др. *Руководство к практическим занятиям по лабораторной диагностике сибирской язвы : учебно-методическое пособие*. Иркутск, 2022, 56 с.
26. Коновалов П. П., Арсентьев О. В., и др. *Применение биологического оружия – реалии современного мира*. Сибирское медицинское обозрение. 2015; 4:79–84.
27. Котенева Е. А., Цыганкова О. И., и др. *Способность к вегетированию и спорообразованию штаммов *Bacillus anthracis* с различными фенотипическими свойствами в условиях, имитирующих почву*. ЖМЭИ. 2023; 100(3):186–193; DOI: 10.36233/0372-9311-304.
28. Кравец Е. В., Дугаржапова З. Ф., и др. *Применение методов латекс-агглютинации и иммунохроматографии для ускоренной идентификации культур *Bacillus anthracis* при эпидемиологических расследованиях вспышек*. Проблемы особо опасных инфекций. 2011; 1(107):81–82; DOI: 10.21055/0370-1069-2011-1(107)-81-82.
29. Куличенко А. Н., Буравцева Н. П., и др. *Сибирская язва на Северном Кавказе, под ред. проф. А. Н. Куличенко*. Майкоп: ООО «Качество», 2016, 198 с.
30. Куличенко А. Н., Еременко Е. И. и др. *Биологические свойства и молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Bacillus anthracis*, выделенных во время вспышки сибирской язвы в Ямало-Ненецком автономном округе в 2016 г.* Проблемы особо опасных инфекций. 2017; 1:94–99; DOI: 10.21055/0370-1069-2017-1-94-99.
31. Куличенко А. Н., Ракитина Е. Л., и др. *Использование теста активации базофилов с антраксином для лабораторной (in vitro) диагностики сибирской язвы*. Проблемы

- особо опасных инфекций. 2012; 3(113):86–88; DOI: 10.21055/0370-1069-2012-3-86-88.
32. Маринин Л. И., Дятлов И. А., и др. *Методы изучения биологических свойств возбудителя сибирской язвы (Учебно-методическое пособие)*, М.: ЗАО МП «ГИГИЕНА», 2009, 304 с.
 33. Маринин Л. И., Шишкова Н. А., и др. *Вариант сибирезявленного вакцинного штамма СТИ-1 с гемолитической и лецитиназной активностями*. Бактериология. 2023; 8(1):23–29; DOI: 10.20953/2500-1027-2023-1-23-29.
 34. Михалкина М. В. *К 100-летию со дня рождения известного врача-патологоанатома, доцента кафедры патологической анатомии СГМИ-УГМУ Фаины Афанасьевны Абрамовой*. Вестник Уральского государственного медицинского университета. 2021; 3:76–78.
 35. Мощник К. В., Лебедев С. М., и др. *Военная эпидемиология: учебно-методическое пособие*, Минск: БГМУ, 2019, 52 с.
 36. МУК 4.2.2413-08 *Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы*, утв. 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.
 37. Низгородова А. С., Мальцева Э. Р., и др. *Детекция *Bacillus anthracis* по генам *profaxa latbda_Va03* посредством ПЦР в реальном времени*. Проблемы особо опасных инфекций. 2022; 3:170–172; DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-170-172.
 38. Никифоров В. В., Никифоров В. Н. *Сибирская язва*. Санкт-Петербург: Эко-Вектор, 2025, 527 с.
 39. Никифоров В. Н. *Кожная форма сибирской язвы человека*. М.: Медицина, 1973, 132 с.
 40. Носков А. Н. *Молекулярные аспекты патогенеза сибирской язвы*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2014; 91(4):92–101.
 41. Озёров М. Ю., Каркищенко В. Н., и др. *Средства для обеззараживания объектов, контаминированных спорами *B. anthracis**. Биомедицина. 2009; 1:28–37.
 42. *Опыт ликвидации вспышки сибирской язвы на Ямале в 2016 году. Под редакцией А. Ю. Поповой, А. Н. Куличенко*, Ижевск: ООО «Принт-2», 2017, 313 с.
 43. *Открытый доклад СВР России за 1993 год. Новый вызов после «холодной войны»: распространение оружия массового уничтожения*, СВР России, 1993, 99 с.
 44. Плиева З. С., Смирнова Т. А., и др. *Структура выростов спор *Bacillus cereus**. Наноиндустрия. 2020; 13(7–8):458–464; DOI: 10.22184/1993-8578.2020.13.7-8.458.464.
 45. Розанов Н. И. *Микробиологическая диагностика заболеваний сельскохозяйственных животных: Руководство для ветеринарных врачей диагностических лабораторий*. Москва: Государственное издательство сельскохозяйственной литературы, 1952, 508 с.
 46. Рязанова А. Г., Еременко Е. И., и др. *Использование методов молекулярного типирования *Bacillus anthracis* в Референс-центре по мониторингу за возбудителем сибирской язвы*. Проблемы особо опасных инфекций. 2011; 4(110):68–70; DOI: 10.21055/0370-1069-2011-4(110)-68-70.

47. Саяпина Л. В., Лобач Р. В., и др. *Современное состояние лабораторной диагностики сибирской язвы: обнаружение и идентификация *Bacillus anthracis**. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2016; 16(1):27–34.
48. *Сибирская язва: актуальные проблемы разработки и внедрения медицинских средств защиты*. Под ред. Г. Г. Онищенко, В. В. Кожухова. Москва: Медицина, 2010, 424 с.
49. Слюсарь Л. И., Беседина Е. И., и др. *Сибирская язва (антракс). Эпидемиология, клиника, лечение, профилактика : Учебное пособие*. Донецк, 1997, 13 с.
50. Супотницький М. В. Розпізнання штучно викликаних сплахів інфекційних хвороб. Актуальна інфектологія. 2014; 2(3):116–141.
51. Тамарин А. Л., Спицын Н. А. *Разработка противосибирезверженной вакцины СТИ-1, в Сборник работ НИИЭГ Красной Армии. Выпуск I. М., 1946, стр. 153–170.*
52. Темплинг В. Я. *Сибирская язва в традиционной культуре русских крестьян Западной Сибири, в Уральский сборник. История. Культура. Религия. Вып.2. Екатеринбург, 1998, 242–257 с.*
53. Феоктистова Н. А., Калдыркаев А. И., и др. Распространение *Bacillus cereus* и *Bacillus mycoides* в объектах санитарного надзора. Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2014; 1(25):68–76.
54. Хлопова К. В. *Распространённость факторов патогенности филогенетической группы *Bacillus cereus complex**. Научно-квалификационная работа (диссертация) по направлению подготовки 06.06.01. Биологические науки (направленность 1.5.11 Микробиология), Оболенск, 2024, 186 с. (не опублик.).
55. Хлопова К. В., Бахтеева И. В., и др. *Потенциальная роль полиморфизма факторов патогенности сибирезверженного микроба в дифференциальной вирулентности его штаммов для лабораторных животных, в сб. Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены: Материалы XIV Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора (Лужки, Сертуховский район, Московская область 22–24 июня 2022 года)*. Под ред. А. Ю. Поповой. Москва: ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф. Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, 2022, 344 с.
56. Хлопова К. В., Бахтеева И. В., и др. *Способ определения острой токсичности супернатантов неантрацидных видов *Bacillus cereus complex* на мышинной модели, в сб. Материалы IX Национального конгресса бактериологов, Москва, 17–19 сентября 2024 года, М.: Издательство «Династия», 2024, 160 с.*
57. Хлопова К. В., Горшков-Кантакузен В. А., и др. *К вопросу визуализации параспоральных тел и спор*. Международный вестник ветеринарии. 2025. 3:84–89; DOI: 10.52419/issn2072-2419.2025.3.84.
58. Хлопова К. В., Горшков-Кантакузен В. А., и др. *Токсичные штаммы *Bacillus thuringiensis*, в Эпидемиология-2025: сборник тезисов Конгресса с международным участием (Москва, 15–16 октября 2025 года), под ред. акад. РАН В. Г. Акимкина, М.: ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. С. 174–175.*
59. Хлопова К. В., Горшков-Кантакузен В. А., и др. **B. thuringiensis* как возможный этиологический агент раневой инфекции, в сб. XIII сборник научных работ «Важнейшие вопросы инфекционных и паразитарных болезней», Тюмень: ФБУН ТНИИКИП Роспотребнадзора. 2025.*

60. Цыганкова О. И., Фунтикова Т. Н., и др. Изучение некоторых свойств субкультур сибирезвненного вакцинного штамма СТИ-1 *ин vitro*, в сб.: Иммунология и специфическая профилактика особо опасных инфекций. Саратов, 1993, 192 с.
61. Черкасский Б. Л. Путешествие эпидемиолога во времени и в пространстве, Воронеж: ФГУП ИПФ «Воронеж», 2003, 640 с.
62. Шульман-Сатин Б. Б., Сучкова Т. И. Изучение безвредности и иммуноморфологических изменений при аэрозольной иммунизации живой сухой полидисперсной сибирезвненной вакциной СТИ в опытах на животных. Проблемы особо опасных инфекций. 1969; 3:33–38.
63. Эпидемиология: пособие для эпидемиологов и санитарных врачей. Составлено сотрудниками Ленинградского института эпидемиологии, микробиологии и гигиены им. Пастера. Ленинград: Государственное издательство медицинской литературы МЕДГИЗ, 1957, 623 с.
64. Юдина М. А., Мустафин А. Х., и др. Диагностика картофельной болезни хлеба, вызываемой бактериями видов *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus*. Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2011; 3(15):61–67.
65. Ярошук В. А., Буравцева Н. П. К вопросу об экологии возбудителя сибирской язвы, в сб. Актуальные вопросы профилактики сибирской язвы: тезисы докладов 13 пленарной межведомственной научно-методической комиссии. Ташкент, 1990.
66. 5th International reference preparation of opacity, WHO International Standard, NIBSC code 76/522, Version 6.0 (2013), 2 p.
67. Abbara A., Brooks T., et al. Lessons for control of heroin-associated anthrax in Europe from 2009–2010 outbreak case studies, London, UK. Emerg Infect Dis. 2014; 20(7):1115–1122; DOI: 10.3201/eid2007.131764.
68. Abdulmawjood A., Herrmann J., et al. Evaluation of enterotoxin gene expression and enterotoxin production capacity of the probiotic strain *Bacillus toyonensis* BCT-7112^T. PLoS One. 2019; 14(4):e0214536; DOI: 10.1371/journal.pone.0214536.
69. Abramova F. A., Grinberg L. M., et al. Pathology of inhalational anthrax in 42 cases from the Sverdlovsk outbreak of 1979. PNAS. 1993; 90(6):2291–2294; DOI: 10.1073/pnas.90.6.2291.
70. Acevedo H. D., Schlesinger M. S., et al. Enterotoxemia produced by lambda toxin-positive *Clostridium perfringens* type D in 2 neonatal goat kids. J Vet Diagn Invest. 2023; 35(4):448–451; DOI: 10.1177/10406387231176995.
71. Agata N., Ohta M., et al. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. FEMS Microbiol Lett. 1995; 129(1):17–20; DOI: 10.1016/0378-1097(95)00119-P.
72. Aggeliadakis J., Lasithiotakis K., et al. Limb salvage after gas gangrene: a case report and review of the literature. World J Emerg Surg. 2011; 6:28; DOI: 10.1186/1749-7922-6-28.
73. Akbulut A., Akbulut H., et al. Gastrointestinal Anthrax: a case and review of literature. Advances in Infectious Diseases. 2012; 2(3):67–71; DOI: 10.4236/aid.2012.23010.
74. Alam M. E., Kamal M. M., et al. Review of anthrax: A disease of farm animals. J Adv Vet Anim Res. 2022; 9(2):323–334; DOI: 10.5455/javar.2022.i599.
75. Alam M. E., Kamal M. M., et al. Review of anthrax: a disease of farm animals. J Adv Vet Anim Res. 2022; 9(2):323–334; DOI: 10.5455/javar.2022.i599.

76. Alba-Tercedor J., Vilchez S. *Anatomical damage caused by Bacillus thuringiensis variety israelensis in yellow fever mosquito Aedes aegypti (L.) larvae revealed by micro-computed tomography*. *Sci Rep*. 2023; 13:8759; DOI: 10.1038/s41598-023-35411-1.
77. Alibek K., Handelman S. *Biohazard: the chilling true story of the largest covert Biological Weapons Program in the world – told from inside by the man who rat it*. Delta, 2000, 336 p.
78. Alremeithi R., Sullivan N., et al. *A clinical approach to an unidentified aerosolized bioterrorism agent: a narrative review for emergency providers*. *Clin Exp Emerg Med*. 2023; 10(2):147–156; DOI: 10.15441/ceem.22.412.
79. Aminu O. R., Lembo T., et al. *Practical and effective diagnosis of animal anthrax in endemic low-resource settings*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020; 14(9):e0008655; DOI: 10.1371/journal.pntd.0008655.
80. Anaraki S., Addiman S., et al. *Investigations and control measures following a case of inhalation anthrax in East London in a drum maker and drummer, October 2008*. *Euro Surveill*. 2008; 13(51):19076.
81. Angus T. A. *A bacterial toxin paralyzing silkworm larvae*. *Nature*. 1954; 173(4403):545–546; DOI: 10.1038/173545a0.
82. Antonation K. S., Grützmacher K., et al. *Bacillus cereus biovar anthracis causing Anthrax in Sub-Saharan Africa – chromosomal monophyly and broad geographic distribution*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10(9):e0004923; DOI: 10.1371/journal.pntd.0004923.
83. Antwerpen M., Braun P., et al. *Archival and newly isolated historical Bacillus anthracis strains populate the deeper phylogeny of the A.Br.075(Sterne) clade*. *Pathogens*. 2025; 14(1):83; DOI: 10.3390/pathogens14010083.
84. Arnesen L. P. S., Fagerlund A., et al. *From soil to gut: Bacillus cereus and its food poisoning toxins*. *FEMS Microbiol Rev*. 2008; 32(4):579–606; DOI: 10.1111/j.1574-6976.2008.00112.x.
85. Ascoli A. *Die Präzipitindiagnose bei Milzbrand*. *Centralbl Bakt Parasit Infect*. 1911; 58:63–70.
86. AuCoin D. P., Sutherland M. D., et al. *Rapid detection of the Poly- γ -D-Glutamic acid capsular antigen of Bacillus anthracis by latex agglutination*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009; 64(2):229–232; DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2009.02.001.
87. Azcón R., Perálvarez M. C., et al. *Arbuscular mycorrhizal fungi, Bacillus cereus, and Candida parapsilosis from a multicontaminated soil alleviate metal toxicity in plants*. *Microb Ecol*. 2010; 59(4):668–677; DOI: 10.1007/s00248-009-9618-5.
88. *Bacillus thuringiensis Berliner: Über seine Biologie, Pathogenie und Anwendung in der biologischen Schädlingsbekämpfung (In memoriam Dr. Ernst Berliner [1880–1957]) von Dr. A. Krieg*. Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem. 1961, 79 p.
89. Bail O. *Untersuchungen über natürliche und künstliche Milzbrandimmunität*. *Zentralbl Bakt Parasiten Infektionskr I rig*. 1904; 36:262–272.
90. Baldwin V. M. *You can't B. cereus – a review of Bacillus cereus strains that cause anthrax-like disease*. *Front Microbiol*. 2020; 11:1731; DOI: 10.3389/fmicb.2020.01731.
91. Bales M. E., Dannenberg A. L., et al. *Epidemiologic response to anthrax outbreaks: field investigations, 1950–2001*. *Emerg Infect Dis*. 2002; 8(10):1163–1174; DOI: 10.3201/eid0810.020223.

92. Barakat S., Kim H., et al. *Bacillus thuringiensis* bacteremia in a 30-year-old Intravenous drug user: a report of a rare case. *Cureus*. 2024; 16(10):e71704; DOI: 10.7759/cureus.71704.
93. Barnes J. M. *Penicillin and B. anthracis*. *J Pathol Bacteriol*. 1947; 59(1-2):113-125; DOI: 10.1002/path.1700590113.
94. Bedoshvili Y., Bayramova E., et al. *Impact of algicidal Bacillus mycoides on diatom Ulnaria acus from Lake Baikal*. *Diversity*. 2021; 13(10):469; DOI: 10.3390/d13100469.
95. Belousova M. E., Malovichko Yu. V., et al. *Dissecting the environmental consequences of Bacillus thuringiensis application for natural ecosystems*. *Toxins (Basel)*. 2021; 13(5):355; DOI: 10.3390/toxins13050355.
96. Benn J. S., Chaki S. P., et al. *Protective antibody response following oral vaccination with microencapsulated Bacillus Anthracis Sterne strain 34F2 spores*. *NPJ Vaccines*. 2020; 5:59; DOI: 10.1038/s41541-020-0208-3.
97. Ben-Shmuel A., Glinert I., et al. *Doxycycline, levofloxacin, and moxifloxacin are superior to ciprofloxacin in treating anthrax meningitis in rabbits and NHP*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2024; 68(6):e0161023; DOI: 10.1128/aac.01610-23.
98. Berliner E. *Über die Schlafsucht der Mehlmottenraupe (Ephestia kühniella Zell.) und ihren Erreger Bacillus thuringiensis n. sp.* *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*. 1915; 2(1):29-56; DOI: 10.1111/j.1439-0418.1915.tb00334.x.
99. Bernal M. A. E., Navarro M. P. M., et al. *Biocontrol activity of Bacillus altitudinis CH05 and Bacillus tropicus CH13 isolated from Capsicum annuum L. seeds against fungal strains*. *Microorganisms*. 2024; 12(10):1943; DOI: 10.3390/microorganisms12101943.
100. Bigalke L. D. *The fourteen editors of the Journal of the South African Veterinary Association: 1927-2000: information*. *Journal of the South African Veterinary Association*. 2000; 71(2):a683; DOI: 10.4102/jsava.v71i2.683.
101. Bizani D., Morrissy J. A. C., et al. *Inhibition of Listeria monocytogenes in dairy products using the bacteriocin-like peptide cerein 8A*. *Int J food Microbiol*. 2008; 121(2):229-233; DOI: 10.1016/j.jifoodmicro.2007.11.016.
102. Blokhin A. A., Toporova N. N., et al. *Blackleg in cattle in the Irkutsk Region*. *Front Vet Sci*. 2022; 9:872386; DOI: 10.3389/fvets.2022.872386.
103. Böhm M.-E., Huptas C., et al. *Massive horizontal gene transfer, strictly vertical inheritance and ancient duplications differentially shape the evolution of Bacillus cereus enterotoxin operons hbl, cytK and nhe*. *BMC Evol Biol*. 2015; 15:246; DOI: 10.1186/s12862-015-0529-4.
104. Borio L., Frank D., et al. *Death due to bioterrorism-related inhalational anthrax: report of 2 patients*. *JAMA*. 2001; 286(20):2554-2559; DOI: 10.1001/jama.286.20.2554.
105. Bottone E. J. *Bacillus cereus, a volatile human pathogen*. *Clin Microbiol Rev*. 2010; 23(2):382-398; DOI: 10.1128/CMR.00073-09.
106. Bower W. A., Yu Y., et al. *CDC Guidelines for the prevention and treatment of Anthrax, 2023*. *MMWR Recomm Rep*. 2023; 72(6):1-47; DOI: 10.15585/mmwr.rr7206a1.
107. Boyer A. E., Quinn C. P., et al. *Lethal factor toxemia and anti-protective antigen antibody activity in naturally acquired cutaneous anthrax*. *J Infect Dis*. 2011; 204(9):1321-1327; DOI: 10.1093/infdis/jir543.
108. Braack L. E., de Vos V. *Feeding habits and flight range of blow-flies (Chrysomya spp.) in relation to anthrax transmission in the Kruger National Park, South Africa*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 1990; 57:141-142.

109. Brauell F. A. *Versuche und Untersuchungen betreffend den Milzbrand des Menschen und der Thiere*. Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin. Neue Folge. 1857; 11:132–144.
110. Braun P., Beyer W., et al. Reoccurring bovine Anthrax in Germany on the same pasture after 12 years. J Clin Microbiol. 2022 Mar; 60(3):e0229121; DOI: 10.1128/jcm.02291-21.
111. Braun P., Nguyen M. D.-T., et al. *Ultrasensitive detection of Bacillus anthracis by Real-Time PCR targeting a polymorphism in multi-copy 16S rRNA genes and their transcripts*. Int J Mol Sci. 2021; 22(22):12224; DOI: 10.3390/ijms222212224.
112. Brézillon C., Haustant M., et al. *Capsules, toxins and AtxA as virulence factors of emerging Bacillus cereus biovar anthracis*. PLoS Negl Trop Dis. 2015; 9(4):e0003455; DOI: 10.1371/journal.pntd.0003455.
113. Brossier F., Levy M., et al. *Anthrax spores make an essential contribution to vaccine efficacy*. Infect Immun. 2002; 70(2):661–664; DOI: 10.1128/IAI.70.2.661-664.2002.
114. Brown E. R., Cherry W. B. *Specific identification of Bacillus anthracis by means of a variant bacteriophage*. J Infect Dis. 1955; 96(1):34–39; DOI: 10.1093/infdis/96.1.34.
115. Brown R. B., Barza M., et al. *Pharmacokinetics of lincomycin and clindamycin phosphate in a canine model*. J Infect Dis. 1975; 131(3):252–260; DOI: 10.1093/infdis/131.3.252.
116. Bryce E. A., Smith J. A., et al. *Dissemination of Bacillus cereus in an intensive care unit*. Infect Control Hosp Epidemiol. 1993; 14(8):459–462; DOI: 10.1086/646779.
117. Buckeridge D. L., Owens D. K., et al. *Evaluating detection of an inhalational anthrax outbreak*. Emerg Infect Dis. 2006; 12(12):1942–1949; DOI: 10.3201/eid1212.060331.
118. Budd W. *Observations on the occurrence of malignant pustule in England illustrated by numerous fatal cases*. Association Medical Journal. 1863; 1(85):110,159,237
119. Cairo J., Cherman I., et al. *Bacillus cytotoxicus - a potentially virulent food-associated microbe*. J Appl Microbiol. 2021; 132(1):31–40; DOI: 10.1111/jam.15214.
120. Callegan M. C., Engelbert M., et al. *Bacterial endophthalmitis: epidemiology, therapeutics, and bacterium-host interactions*. Clin Microbiol Rev. 2002; 15(1):111–124; DOI: 10.1128/CMR.15.1.111-124.2002.
121. Candela T., Fouet A. *Bacillus anthracis CapD, belonging to the gamma-glutamyltranspeptidase family, is required for the covalent anchoring of capsule to peptidoglycan*. Mol Microbiol. 2005; 57(3):717–726; DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04718.x.
122. Cao H., Yang Y., et al. *Bacillus mycoides: an emerging pathogen of ulcerative disease in farmed largemouth bass Micropterus salmoides*. Isr J Aquac Bamidgheh. 2018; 70:1548; DOI: 10.46989/001c.20908.
123. Cao X., Cai J., et al. *Biodegradation of uric acid by Bacillus paramycoides-YC02*. Microorganisms. 2023; 11(8):1989; DOI: 10.3390/microorganisms11081989.
124. Carlson C. J., Kracalik I. T. *The global distribution of Bacillus anthracis and associated anthrax risk to humans, livestock and wildlife*. Nat Microbiol. 2019; 4(8):1337–1343; DOI: 10.1038/s41564-019-0435-4.
125. Carroll L. M., Cheng M., et al. *Keeping up with the Bacillus cereus group: taxonomy through the genomics era and beyond*. Crit Rev Food Sci Nutr. 2022; 62(28):7677–7702; DOI: 10.1080/10408398.2021.1916735.

126. Carroll L. M., Marston C. K., et al. *Strains Associated with Two 2020 Welder Anthrax Cases in the United States Belong to Separate Lineages within Bacillus cereus sensu lato*. *Pathogens*. 2022; 11(8):856; DOI: 10.3390/pathogens11080856.
127. Carroll L. M., Wiedmann M., et al. *Proposal of a taxonomic nomenclature for the Bacillus cereus group which reconciles genomic definitions of bacterial species with clinical and industrial phenotypes*. *mBio*. 2020; 11(1):e00034–20; DOI: 10.1128/mBio.00034–20.
128. Chabert P. *Description et traitement du charbon dans les animaux*. Paris: Imprimerie royale, 1780
129. Chakrabarty K., Wu W., et al. *Bacillus anthracis spores stimulate cytokine and chemokine innate immune responses in human alveolar macrophages through multiple mitogen-activated protein kinase pathways*. *Infect Immun*. 2006; 74(8):4430–4438. doi: 10.1128/IAI.00446–06.
130. Chateau A., der Verren S. E., et al. *The Bacillus anthracis cell envelope: composition, physiological role, and clinical relevance*. *Microorganisms*. 2020; 8(12):1864; DOI: 10.3390/microorganisms8121864.
131. Chen J., Zhu N., et al. *First reported fatal Bacillus thuringiensis infections in Chinese softshelled turtles (Trionyx sinensis)*. 2014. *Aquaculture*; 428–429:16–20; DOI: 10.1016/j.aquaculture.2014.02.018.
132. Cheng L.-W., Byadgi O. V., et al. *Pathogenicity and genomic characterization of a novel genospecies, Bacillus shihchuchen, of the Bacillus cereus group isolated from Chinese softshell turtle (Pelodiscus sinensis)*. *Int J Mol Sci*. 2023; 24(11):9636; DOI: 10.3390/ijms24119636.
133. Cheng L.-W., Huang Q.-Y., et al. *Transcriptome and pathophysiological analysis during Bacillus cereus group infection in Pelodiscus sinensis uncovered the importance of iron and toll like receptor pathway*. *Aquaculture*. 2025; 594:741424; DOI: 10.1016/j.aquaculture.2024.741424.
134. Cheng L.-W., Rao S., et al. *Genotype and virulence gene analyses of Bacillus cereus group clinical isolates from the Chinese softshell turtle (Pelodiscus sinensis) in Taiwan*. *J Fish Dis*. 2021; 44(10):1515–1529; DOI: 10.1111/jfd.13473.
135. Chiaverini A., Abdel-Glil M. Y., et al. *Whole genome sequencing for studying Bacillus anthracis from an outbreak in the Abruzzo Region of Italy*. *Microorganisms*. 2020; 8(1):87; DOI: 10.3390/microorganisms8010087.
136. Çimen C. *Typical evolution of a Cutaneous Anthrax lesion*. *Infect Dis Clin Microbiol* 2020; 1: 27–29.
137. Clark A., Wolfe D. N. *Current state of anthrax vaccines and key R&D gaps moving forward*. *Microorganisms*. 2020; 8(5):651; DOI: 10.3390/microorganisms8050651.
138. Cohn F. J. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen, Bd. II, Heft 2*, Breslau: J.U. Kerns Verlag, 1876, 277 p.
139. *Communicable Disease Center. Cutaneous anthrax – New Jersey*. *MMWR*. 1965; 14:308.
140. Coons A. H., Kaplan M. H. *Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody*. *J Exp Med*. 1950; 91(1):1–13; DOI: 10.1084/jem.91.1.1.
141. Cowles P. B. *A Bacteriophage for B. anthracis*. *J Bacteriol*. 1931; 21(3):161–166; DOI: 10.1128/jb.21.3.161–166.1931.
142. Cowles P. B., Hale M. W. *Effect of bacteriophage on experimental anthrax in white mice*. *J Infect Dis*. 1931; 49(3):264–269.

143. Cuevas I., Carbonero A., et al. *First outbreak of bovine haemorrhagic septicaemia caused by Pasteurella multocida type B in Spain – Short communication.* Acta Vet Hung. 2020; 68(1):8–11; DOI: 10.1556/004.2020.00014.
144. Davaine C. *Expériences relatives à la durée de l'incubation des maladies charbonneuses et à la quantité de virus nécessaire à la transmission de la maladie.* Bulletin de l'Académie impériale de Médecine. 1868; 33:816–821.
145. Davaine C. *Nouvelles recherches sur les infusoires du sang dans la maladie connue sous le nom de sang de rate.* Comptes rendus de l'Académie des Sciences. 1863; 57:351–353, 386–387.
146. Davaine C. *Recherches sur les infusoires du sang dans la maladie connue sous le nom de sang de rate.* Comptes rendus de l'Académie des Sciences. 1863; 57:220–223.
147. Dawson P., Schrodt C. A., et al. *Notes from the Field: Fatal Anthrax Pneumonia in Welders and Other Metalworkers Caused by Bacillus cereus Group Bacteria Containing Anthrax Toxin Genes – U.S. Gulf Coast States, 1994–2020.* MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2021; 70(41):1453–1454; DOI: 10.15585/mmwr.mm7041a4.
148. De B. K., Bragg S. L., et al. *Two-component direct fluorescent-antibody assay for rapid identification of Bacillus anthracis.* Emerg Infect Dis. 2002; 8(10):1060–1065; DOI: 10.3201/eid0810.020392.
149. De Barjac H. *Identification of H-serotypes of Bacillus thuringiensis, in Microbial control of pests and plant diseases.* Ed.: H. D. Burges. London: The Academic Press Co., 1981, 949 P.
150. De Cecco B. S., Falconnier N. G., et al. *Pathologic and genomic characterization of an outbreak of anthrax-like disease caused by Bacillus tropicus (formerly atypical Bacillus cereus) in red kangaroos (Macropus rufus).* Vet Pathol. 2025; 62(3):332–342; DOI: 10.1177/03009858241306399.
151. De Jesus Sousa A. I., Galvão C. C., et al. *Blackleg: A Review of the Agent and Management of the Disease in Brazil.* Animals (Basel). 2024; 14(4):638; DOI: 10.3390/ani14040638.
152. Debaisieux P. *Organsmes bacilliformes à structure parasporale spiralée.* Ann Soc Sci Bruxe. 1926; 45:94–96.
153. Debaisieux P. *Structures parasporales chez les bactéries.* Ann Soc Sci Bruxe. 1927; 47:89–90.
154. Di Franco C., Beccari E., et al. *Colony shape as a genetic trait in the pattern-forming Bacillus mycoides.* BMC Microbiol. 2002; 2:33; DOI: 10.1186/1471-2180-2-33.
155. Diaz E., Serrano-Coll H., et al. *Case Report: Septic shock due to Pasteurella multocida in an immunocompetent elderly from a rural area of the Colombian Caribbean.* Front. Trop. Dis. 2023; 3:1047842; DOI: 10.3389/fitd.2022.1047842.
156. Dierick K., Coillie E. V., et al. *Fatal family outbreak of Bacillus cereus-associated food poisoning.* J Clin Microbiol. 2005; 43(8):4277–4279; DOI: 10.1128/JCM.43.8.4277-4279.2005.
157. Doğanay M., Almaç A., et al. *Primary throat anthrax. A report of six cases.* Scand J Infect Dis. 1986; 18(5):415–419; DOI: 10.3109/00365548609032357.
158. Dohmae S., Okubo T., et al. *Bacillus cereus nosocomial infection from reused towels in Japan.* J Hosp Infect. 2008; 69(4):361–367; DOI: 10.1016/j.jhin.2008.04.014.

159. Dong S., McPherson S. A., et al. *Anthrose biosynthetic operon of Bacillus anthracis*. J Bacteriol. 2008; 190(7):2350–2359; DOI: 10.1128/JB.01899–07.
160. Dr. Chas. H. Higgins. Can J Comp Med Vet Sci. 1954; 18(12):425.
161. Dracon D. C., Rennie R. P. *The ecology of anthrax spores: tough but not invincible*. Can Vet J. 1995; 36(5):295–301.
162. Driks A. *The Bacillus anthracis spore*. Mol Aspects Med. 2009; 30(6):368–373; DOI: 10.1016/j.mam.2009.08.001.
163. Du Y., Ma J., et al. *In-depth exploration of cutaneous anthrax: clinical and pathological manifestations of a case report*. Diagn Pathol. 2024; 19:158; DOI: 10.1186/s13000–024–01587-x.
164. Duong-Nguyen T. A., Pham M. H., et al. *Amoxicillin degradation ability of Bacillus cereus C1 isolated from catfish pond sludge in Vietnam*. Heliyon. 2022; 8(11):e11688; DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e11688.
165. EFSA BIOHAZ Panel. *Risks for public health related to the presence of Bacillus cereus and other Bacillus spp. including Bacillus thuringiensis in foodstuffs*. EFSA J. 2016; 14:4524; DOI: 10.2903/j.efsa.2016.4524.
166. Ehling-Schulz M., Fricker M., et al. *Cereulide synthetase gene cluster from emetic Bacillus cereus: Structure and location on a mega virulence plasmid related to Bacillus anthracis toxin plasmid pXO1*. BMC Microbiol. 2006; 6:20; DOI: 10.1186/1471–2180–6–20.
167. El Saleeby C. M., Howard S. C., et al. *Association between tea ingestion and invasive Bacillus cereus infection among children with cancer*. Clin Infect Dis. 2004; 39(10):1536–1539; DOI: 10.1086/425358.
168. Eremenko E., Pechkovskii G. et al. *Phylogenetics of Bacillus anthracis isolates from Russia and bordering countries*. Infection, Genetics and Evolution. 2021; 92:104890; DOI: 10.1016/j.meegid.2021.104890.
169. Erkek E., Ayaslioglu E., et al. *An unusually extensive case of cutaneous anthrax in a patient with type II diabetes mellitus*. Clinical and Experimental Dermatology. 2005; 30(6):652–654; DOI: 10.1111/j.1365–2230.2005.01893.x.
170. Esmkhani M., Shams S. *Cutaneous infection due to Bacillus cereus: a case report*. BMC Infect Dis. 2022; 22:393; DOI: 10.1186/s12879–022–07372–9.
171. Ezhova E., Orlov D., et al. *Climatic factors influencing the anthrax outbreak of 2016 in Siberia, Russia*. Ecohealth. 2021; 18(2):217–228; DOI: 10.1007/s10393–021–01549–5.
172. Fagerlund A., Brilliard J., et al. *Toxin production in a rare and genetically remote cluster of strains of the Bacillus cereus group*. BMC Microbiol. 2007; 7:43; DOI: 10.1186/1471–2180–7–43.
173. Fasanella A., Van Ert M., et al. *Molecular diversity of Bacillus anthracis in Italy*. J Clin Microbiol. 2005; 43(7):3398–3401; DOI: 10.1128/JCM.43.7.3398–3401.2005.
174. Ferris A. M., Dawson D. G., et al. *Bacillus cereus biovar anthracis causes inhalational anthrax-like disease in rabbits that is treatable with medical countermeasures*. PLoS Negl Trop Dis. 2025; 19(4):e0012973; DOI: 10.1371/journal.pntd.0012973.
175. Finlay W. J., Logan N. A., et al. *Semiautomated metabolic staining assay for Bacillus cereus emetic toxin*. Appl Environ Microbiol. 1999; 65(4):1811–1812; DOI: 10.1128/AEM.65.4.1811–1812.1999.
176. Fitzgerald J. G. *Pasteur and the Science of Bacteriology*. The Scientific Monthly. 1923; 17(1):23–29.
177. Flügge C. *Die Mikroorganismen, 2nd ed*. Leipzig: Verlag F C W Vogel, 1886.

178. Flügge C. *Die Mikroorganismen: mit besonderer Berücksichtigung der Ätiologie der Infektionskrankheiten*, Leipzig, 1886, 692 p.
179. Foggin C. M., Rosen L. E., et al. *Pasteurella sp. associated with fatal septicaemia in six African elephants*. *Nat Commun.* 2023; 14(1):6398; DOI: 10.1038/s41467-023-41987-z.
180. Forrest S., Ton S., et al. *Genetic evidence for the interaction between Bacillus anthracis-encoded phage receptors and their cognate phage-encoded receptor binding proteins*. *Front Microbiol.* 2023; 14:1278791; DOI: 10.3389/fmicb.2023.1278791.
181. Fournier N. *Observations et expériences sur le charbon malin, avec une méthode assurée de la guérir*. Dijon: Defay, 1769.
182. Frankland P. F., Frankland G. C. XI. *Studies on some new micro-organisms obtained from air*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 1887; 178:257-287; DOI: 10.1098/rstb.1887.0011.
183. Frey J., Johansson A., et al. *Cytotoxin CctA, a major virulence factor of Clostridium chauvoei conferring protective immunity against myonecrosis*. *Vaccine.* 2012; 30(37):5500-5505; DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.06.050.
184. Friedlander A. M., Welkos S. L., et al. *Anthrax vaccines*. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2002; 271:33-60; DOI: 10.1007/978-3-662-05767-4_3.
185. Frischknecht F. *The history of biological warfare. Human experimentation, modern nightmares and lone madmen in the twentieth century*. *EMBO Rep.* 2003; 4 Spec No(Suppl 1):S47-52; DOI: 10.1038/sj.embor.embor849.
186. Garufi G., Hendricks A., et al. *Synthesis of lipoteichoic acids in Bacillus anthracis*. *J Bacteriol.* 2012; 194(16):4312-4321; DOI: 10.1128/JB.00626-12.
187. Gates-Hollingsworth M. A., Kolton C. B., et al. *Rapid capsular antigen immunoassay for diagnosis of inhalational Anthrax: preclinical studies and evaluation in a nonhuman primate model*. *mBio.* 2022; 13(3):e00931-22; DOI: 10.1128/mbio.00931-22.
188. Gazioğlu A., Karagülle B., et al. *Sudden death due to gas gangrene caused by Clostridium septicum in goats*. *BMC Vet Res.* 2018; 14(1):406; DOI: 10.1186/s12917-018-1747-y.
189. Ghelardi E., Celandroni F., et al. *Swarming behavior of and hemolysin BL secretion by Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73(12):4089-4093; DOI: 10.1128/AEM.02345-06.
190. Girault G., Thierry S., et al. *Application of high-throughput sequencing: discovery of informative SNPs to subtype Bacillus anthracis*. *Advances in Bioscience and Biotechnology.* 2014; 5(7):669-677; DOI: 10.4236/abb.2014.57079.
191. Girisch M., Ries M., et al. *Intestinal perforations in a premature infant caused by Bacillus cereus*. *Infection.* 2003; 31(3):192-193; DOI: 10.1007/s15010-002-3037-6.
192. Gladston G. P. *Immunity to anthrax: protective antigen present in cell-free culture filtrates*. *Br J Exp Pathol.* 1946; 27(6):394-418.
193. Glenwright H., Pohl S., et al. *The Identification of Intrinsic Chloramphenicol and Tetracycline Resistance Genes in Members of the Bacillus cereus Group (sensu lato)*. *Front Microbiol.* 2017; 7:2122; DOI: 10.3389/fmicb.2016.02122.
194. Glomski I. J., Piris-Gimenez A., et al. *Primary involvement of pharynx and peyer's patch in inhalational and intestinal anthrax*. *PLoS Pathog.* 2007; 3(6):e76; DOI: 10.1371/journal.ppat.0030076.
195. Golpin G. G., Guiot H. F., et al. *Bacillus cereus meningitis in a patient under gnotobiotic care*. *Lancet.* 1981; 2(8248):694-695; DOI: 10.1016/s0140-6736(81)91025-4.

196. Gonzalez-Vazquez M. C., Vela-Sanchez R. A., et al. *Importance of Cry proteins in biotechnology: initially a bioinsecticide, now a vaccine adjuvant*. *Life (Basel)*. 2021; 11(10):999; DOI: 10.3390/life11100999.
197. Goodwin A. E., Roy J. S., et al. *Bacillus mycoides: a bacterial pathogen of channel catfish*. *Dis Aqual Org*. 1994; 18:173–179.
198. Gram H. C. *Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten*. *Fortschr Med*. 1884; 2:185–189.
199. Gräßle T., Jäger C., et al. *Neuroinfectiology of an atypical anthrax-causing pathogen in wild chimpanzees*. *eLife*. 2024; 13:RP93526; DOI: 10.7554/eLife.93526.1.
200. Green B. D., Battisti L., et al. *Demonstration of a capsule plasmid in Bacillus anthracis*. *Infect Immun*. 1985; 49(2):291–297; DOI: 10.1128/iai.49.2.291–297.1985.
201. Grierson A. M. M. *“Bacillus Anthracoides”. A study of its biological characters and relationships and its pathogenic properties under experimental conditions*. *J Hyg (Lond)*. 1928; 27(3):306–320; DOI: 10.1017/s0022172400032022.
202. Griffith J., Blaney D., et al. *Investigation of inhalation anthrax case, United States*. *Emerg Infect Dis*. 2014; 20(2):280–283; DOI: 10.3201/eid2002.130021.
203. Grunow R., Verbeek L., et al. *Injection Anthrax: a new outbreak in heroin users*. *Dtsch Arztebl Int*. 2012; 109(49): 843–848; DOI: 10.3238/arztebl.2012.0843.
204. Guichard A., Nizet V., et al. *New insights into the biological effects of anthrax toxins: linking cellular to organismal responses*. *Microbes Infect*. 2012; 14(2):97–118; DOI: 10.1016/j.micinf.2011.08.016.
205. Guidi-Rontani C. *The alveolar macrophage: the Trojan horse of Bacillus anthracis*. *Trends Microbiol*. 2002; 10(9):405–409; DOI: 10.1016/s0966–842x(02)02422–8.
206. Guidi-Rontani C., Pereira Y., et al. *Identification and characterization of a germination operon on the virulence plasmid pXO1 of Bacillus anthracis*. *Mol Microbiol*. 1999; 33(2):407–414; DOI: 10.1046/j.1365–2958.1999.01485.x.
207. Guidi-Rontani C., Weber-Levy M., et al. *Germination of Bacillus anthracis spores within alveolar macrophages*. *Mol Microbiol*. 1999; 31(1):9–17; DOI: 10.1046/j.1365–2958.1999.01137.x.
208. Guinebretière M. H., Auger S., et al. *Bacillus cytotoxicus sp. nov. is a novel thermotolerant species of the Bacillus cereus Group occasionally associated with food poisoning*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2013; 63:31–40; DOI: 10.1099/ijss.0.030627–0.
209. Guinebretière M.-H., Thompson F. L., et al. *Ecological diversification in the Bacillus cereus Group*. *Environ Microbiol*. 2008; 10(4):851–865; DOI: 10.1111/j.1462–2920.2007.01495.x.
210. Guiot H. F., de Planque M. M., et al. *Bacillus cereus: a snake in the grass for granulocytopenic patients*. *J Infect Dis*. 1986; 153(6):1186; DOI: 10.1093/infdis/153.6.1186.
211. Guo R., Tian Y., et al. *Biological characteristics and genetic evolutionary analysis of emerging pathogenic Bacillus cereus isolated from Père David's deer (Elaphurus davidianus)*. *Microb Pathog*. 2020; 143:104133; DOI: 10.1016/j.micpath.2020.104133.
212. Han C. S., Xie G. et al. *Pathogenomic sequence analysis of Bacillus cereus and Bacillus thuringiensis isolates closely related to Bacillus anthracis*. *J Bacteriol*. 2006; 188(9):3382–3390; DOI: 10.1128/JB.188.9.3382–3390.2006.

213. Hang'ombe B. M., Kohda T., et al. *Purification and sensitivity of Clostridium chauvoei hemolysin to various erythrocytes*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2006; 29(4):263–268; DOI: 10.1016/j.cimid.2006.06.002.
214. Hardenbrook N. J., Liu S., et al. *Atomic structures of anthrax toxin protective antigen channels bound to partially unfolded lethal and edema factors*. *Nat Commun*. 2020; 11:840; DOI: 10.1038/s41467-020-14658-6.
215. Harrison L. H., Ezzell J. W., et al. *Evaluation of serologic tests for diagnosis of anthrax after an outbreak of cutaneous anthrax in Paraguay*. *J Infect Dis*. 1989; 160(4):706–710; DOI: 10.1093/infdis/160.4.706.
216. Hart B. L., Ketai L. *Armies of pestilence: CNS infections as potential weapons of mass destruction*. *AJNR*. 2015; 36(6):1018–1025; DOI: 10.3174/ajnr.A4177.
217. Hassim A., Lekota K. E., et al. *A unique isolation of a lytic bacteriophage infected Bacillus anthracis isolate from Pafuri, South Africa*. *Microorganisms*. 2020; 8(6):932; DOI: 10.3390/microorganisms8060932.
218. Heaslip W. *Bacillus tropicus, a new species isolated from man and animals described and compared with other Bacilli resembling, Bacillus anthracis*. *Med J Australia*. 1941; 2(19):536–543; DOI: 10.5694/j.1326-5377.1941.tb54246.xopen_in_new.
219. Heidt J., Papaloukas N., et al. *A rare bloodstream infection: Bacillus mycoides*. *Neth J Med*. 2019; 77(6):227–230.
220. Heimpel A. M., Angus T. A. *Bacterial insecticides*. *Bacteriol Rev*. 1960; 24(3):266–288; DOI: 10.1128/br.24.3.266-288.1960.
221. Helgason E., Okstad O. A., et al. *Bacillus anthracis, Bacillus cereus, and Bacillus thuringiensis - one species on the basis of genetic evidence*. *Appl Environ Microbiol*. 2000; 66(6):2627–2630; DOI: 10.1128/AEM.66.6.2627-2630.2000.
222. Hendricks K., Martines R. B., et al. *Welder's Anthrax: A Tale of 2 Cases*. *Clin Infect Dis*. 2022; 75(Suppl 3):S354–S363; DOI: 10.1093/cid/ciac535.
223. Hendriks K., Person M. K., et al. *Clinical features of patients hospitalized for all routes of Anthrax, 1880–2018: a systematic review*. *Clin Infect Dis*. 2022; 75:341–353; DOI: 10.1093/cid/ciac534.
224. Heninger S. J., Anderson C. A., et al. *Decontamination of Bacillus anthracis spores: evaluation of various disinfectants*. *Appl Biosaf*. 2009; 14(1):7–10; DOI: 10.1177/153567600901400103.
225. Henriques A. O., Moran C. P. *Structure, assembly, and function of the spore surface layers*. *Annu Rev Microbiol*. 2007; 61:555–588; DOI: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093224.
226. Hermanson G., Whitlow V., et al. *A cationic lipid-formulated plasmid DNA vaccine confers sustained antibody-mediated protection against aerosolized anthrax spores*. *PNAS*. 2004; 101(37):13601–13606; DOI: 10.1073/pnas.0405557101.
227. Higgins C. H. *Anthrax*. Health of animals branch. Bulletin No.23, Ottawa: Department of Agriculture, 1916, 8 p.
228. Hoffmaster A. R., Hill K. K., et al. *Characterization of Bacillus cereus isolates associated with fatal pneumonias: strains are closely related to Bacillus anthracis and harbor B. anthracis virulence genes*. *J Clin Microbiol*. 2006; 44(9):3352–3360; DOI: 10.1128/JCM.00561-06.

229. Hoffmaster A. R., Ravel J., et al. *Identification of anthrax toxin genes in a Bacillus cereus associated with an illness resembling inhalation anthrax*. PNAS. 2004; 101(22):8449–8454; DOI: 10.1073/pnas.0402414101.
230. Hofmann F. *Robert Koch (1843–1910): Begründer einer neuen Wissenschaft*. Dtsch Arztebl. 2010; 107(21):A-1067/B-939/C-927.
231. Holty J.-E. C., Kim R. Y., et al. *Anthrax: a systematic review of atypical presentations*. Ann Emerg Med. 2006; 48(2):200–211; DOI: 10.1016/j.annemergmed.2005.11.035.
232. Hoonstra D., Andersson M. A., et al. *A new method for in vitro detection of microbially produced mitochondrial toxins*. Toxicol In Vitro. 2003; 17(5–6):745–751; DOI: 10.1016/s0887-2333(03)00097-3.
233. Hoton F. M., Andrup L., et al. *The cereulide genetic determinants of emetic Bacillus cereus are plasmid-borne*. Microbiology. 2005; 151:2121–2124; DOI: 10.1099/mic.0.28069-0.
234. Houry A., Gohar M., et al. *Bacterial swimmers that infiltrate and take over the biofilm matrix*. PNAS. 2012; 109(32):13088–13093; DOI: 10.1073/pnas.1200791109.
235. Hu H., Sa Q., et al. *Inactivation of Bacillus anthracis spores in murine primary macrophages*. Cell Microbiol. 2006; 8(10):1634–1642; DOI: 10.1111/j.1462-5822.2006.00738.x.
236. Huang X., Wang Y., et al. *A novel selenite-reducing bacterium Bacillus pseudomycooides SA14 isolated from Se-enriched soil and its potential Se biofortification on Brassica chinensis L.* J Earth Sci. 2025; 36:1756–1765; DOI: 10.1007/s12583-022-1676-3.
237. Huang Y.-H., Kausrud K., et al. *Environmental drivers of biseasonal anthrax outbreak dynamics in two multihost savanna systems*. Ecological monographs. 2022; 92(4):e1526; DOI: 10.1002/ecm.1526.
238. Hugh-Jones M., Blackburn J. *The ecology of Bacillus anthracis*. Mol Aspects Med. 2009; 30(6):356–367; DOI: 10.1016/j.mam.2009.08.003.
239. *Inactivation of microorganisms in sewage sludge by stabilisation processes*, Ed.: A. H. Havelaar, P. L'Hermite, D. Strauch. London: Elsevier Applied Science Publications, 1985, 137 p.
240. *Infection disease of animals, disease due to bacteria, Vol.1*, Ed.: Stableforth A. W., Galloway I. A., London: Butterworth, 1959.
241. Isha, Ali S., et al. *Biodegradation of polyethylene using Bacillus tropicus isolated from sewage wastewater treatment plant*. Processes. 2024; 12(11):2516; DOI: 10.3390/pr12112516.
242. Ishida R., Ueda K., et al. *Fatal community-acquired Bacillus cereus pneumonia in an immunocompetent adult man: a case report*. BMC Infect Dis. 2019; 19:197; DOI: 10.1186/s12879-019-3836-3.
243. Jansen H. J., Breeveld F. J., et al. *Biological warfare, bioterrorism, and biocrime*. Clin Microbiol Infect. 2014; 20(6):488–496; DOI: 10.1111/1469-0691.12699.
244. Jenkins A., Cote C., et al. *Role of purine biosynthesis in Bacillus anthracis pathogenesis and virulence*. Infect Immun. 2011; 79(1):153–166; DOI: 10.1128/IAI.00925-10.
245. Jenkins S. A., Xu Y. *Characterization of Bacillus anthracis persistence in vivo*. PLoS One. 2013; 8(6):e66177; DOI: 10.1371/journal.pone.0066177.
246. Jeon J. H., Kim Y. H., et al. *Bacillus anthracis genomic DNA enhances lethal toxin-induced cytotoxicity through TNF- α production*. BMC Microbiol. 2014; 14:300; DOI: 10.1186/s12866-014-0300-9.

247. Jernigan D. B., Raghunathan P. L., et al. *Investigation of bioterrorism-related Anthrax, United States, 2001: epidemiologic findings*. Emerg Infect Dis. 2002; 8(10):1019–1028; DOI: 10.3201/eid0810.020353.
248. Jernigan J. A., Stephens D. S., et al. *Bioterrorism-related inhalational anthrax: the first 10 cases reported in the United States*. Emerg Infect Dis. 2001; 7(6):933–944; DOI: 10.3201/eid0706.010604.
249. Jiao J., Chen J., et al. *The pathology and splenic transcriptome profiling of *Trionyx sinensis* challenged with *Bacillus cereus**. Fishes. 2023; 8(2):84; DOI: 10.3390/fishes8020084.
250. Jiménez G., Urdiain M., et al. *Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations*. Syst Appl Microbiol. 2013; 36(6):383–391; DOI: 10.1016/j.syapm.2013.04.008.
251. Johns N., Cooper D., et al. *An unusual case of peritonitis in an intravenous drug user*. Gastroenterology. 2011; 141(2):435–436, 780–781; DOI: 10.1053/j.gastro.2011.02.076.
252. Johnson D. A., Aulicino P. L., et al. **Bacillus cereus*-induced myonecrosis*. J Trauma. 1984; 24(3):267–270; DOI: 10.1097/00005373-198403000-00015.
253. Jończyk-Matysiak E., Klak M., et al. *Possible use of bacteriophages active against *Bacillus anthracis* and other *B. cereus* group members in the face of a bioterrorism threat*. Biomed Res Int. 2014; 2014:735413; DOI: 10.1155/2014/735413.
254. Junior C. A. O., Silva R. O. S., et al. *Gas gangrene in mammals: a review*. J Vet Diagn Invest. 2020; 32(2):175–183; DOI: 10.1177/1040638720905830.
255. Justin M.-P. *Histoire politique et statistique de l' ile d' Hayti, Saint-Domingue, écrite sur les documents officiels et des notes communiqués par Sir James Barskett*, Paris: Brière, 1826.
256. Kailas L., Terry C., et al. *Surface architecture of endospores of the *Bacillus cereus/anthracis/thuringiensis* family at the subnanometer scale*. PNAS. 2011; 108(38):16014–16019; DOI: 10.1073/pnas.1109419108.
257. Kalinoski M. **Bacillus thuringiensis* bacteremia in an IV drug user*. Am J Respir Crit Care Med. 2023; 207:A5336.
258. Kaneda T. *Fatty acids in the genus *Bacillus* I. Iso- and anteiso-fatty acids as characteristic constituents of lipids in 10 species*. J Bacteriol. 1967; 93(3):894–903; DOI: 10.1128/jb.93.3.894-903.1967.
259. Kayış Ş. Er A., et al. *Bacterial pathogens and health problems of *Acipenser gueldenstaedtii* and *Acipenser baerii* sturgeons reared in the eastern Black Sea region of Turkey*. Iran J Vet Res. 2017; 18(1):18–24.
260. Kazantseva O. A., Kulyabin V. A., et al. *The genome sequence of *Bacillus toyonensis* strain IP 5832 isolated from the probiotic “*Bactisubtil*” contains genes of *Bacillus cereus* pathogenicity factors and antibiotic resistance*. Microbiology. 2024; 93:973–981; DOI: 10.1134/S0026261724606870.
261. Keim P., Kalif A., et al. *Molecular evolution and diversity in *Bacillus anthracis* as detected by amplified fragment length polymorphism markers*. J Bacteriol. 1997; 179(3):818–824.
262. Keim P., Price L. B., et al. *Multiple-Locus Variable-Number Tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis**. J Bacteriol. 2000; 182:2928–2936; DOI: 10.1128/JB.182.10.2928-2936.2000.
263. Kerkenezov N. *Panophthalmitis after a blood transfusion*. Br J Ophthalmol. 1953; 37(10):632–636; DOI: 10.1136/bjo.37.10.632.

264. Kim C., Wilcox-Adelman S., et al. *Antiinflammatory cAMP signaling and cell migration genes co-opted by the anthrax bacillus*. PNAS. 2008; 105(16):6150–6145; DOI: 10.1073/pnas.0800105105.
265. Kim H. J., Jun W. B., et al. *CT and MR findings of anthrax meningoencephalitis: report of two cases and review of the literature*. AJNR. 2001; 22(7):1303–1305.
266. Kintzer A. F., Tang I. L., et al. *Anthrax toxin protective antigen integrates poly- γ -D-glutamate and pH signals to sense the optimal environment for channel formation*. PNAS. 2002; 109(45):18378–18383; DOI: 10.1073/pnas.1208280109.
267. Kintzer A. F., Thoren K. L., et al. *The protective antigen component of anthrax toxin forms functional octameric complexes*. J Mol Biol. 2009; 392(3):614–629; DOI: 10.1016/j.jmb.2009.07.037.
268. Kircher S., Wössner R., et al. *Lethal pneumatosis coli in a 12-month-old child caused by acute intestinal gas gangrene after prolonged artificial nutrition: a case report*. J Med Case Rep. 2008; 2:238; DOI: 10.1186/1752-1947-2-238.
269. Klee S. R., Brzuszkiewicz E., et al. *The genome of a Bacillus isolate causing Anthrax in chimpanzees combines chromosomal properties of B. cereus with B. anthracis virulence plasmids*. PLoS One. 2010; 5(7):e10986; DOI: 10.1371/journal.pone.0010986.
270. Klee S. R., Özel M., et al. *Characterization of Bacillus anthracis-like bacteria isolated from wild great apes from Côte d'Ivoire and Cameroon*. J Bacteriol. 2006; 188(15):5333–5344; DOI: 10.1128/JB.00303-06.
271. Klempner M. S., Talbot E. A., et al. *Case 25-2010 – A 24-year-old woman with abdominal pain and shock*. N Engl J Med 2010; 363:766–777; DOI: 10.1056/NEJMcp1003887.
272. Koch R. *Die Ätiologie der Milzbrand-Krankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte des Bacillus Anthracis*, Berlin, 1876, 26 p.
273. Koehler T. M. *Bacillus anthracis genetics and virulence gene regulation*. Curr Top Microbiol Immunol. 2002; 271:143–164; DOI: 10.1007/978-3-662-05767-4_7.
274. Kolton C. B., Podnesky N. L., et al. *Bacillus anthracis gamma phage lysis among soil bacteria: an update on test specificity*. BMC Res Notes. 2017; 10(1):598; DOI: 10.1186/s13104-017-2919-8.
275. Konstantinidis K. T., Tiedje J. M. *Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes*. PNAS. 2005; 102(7):2567–2572; DOI: 10.1073/pnas.0409727102.
276. Kraneveld F. C., Djaenodin M. *Test on the dissemination of anthrax by Tabanus rubidus, in horses and buffalo*. Overgedrukt uit de Nederlandsindische Bladen Voor Dieregeneeskunde. 1940; 52:339–380.
277. Kravchenko T., Titareva G., et al. *Using a Syrian (Golden) hamster biological model for the evaluation of recombinant Anthrax vaccines*. Life (Basel). 2021; 11(12):1388; DOI: 10.3390/life11121388.
278. Kubler-Kielb J., Vinogradov E., et al. *Saccharides cross-reactive with Bacillus anthracis spore glycoprotein as an anthrax vaccine component*. PNAS. 2008; 105(25):8709–8712; DOI: 10.1073/pnas.0803897105.
279. Kuehnert M. J., Doyle T. J., et al. *Clinical features that discriminate inhalational anthrax from other acute respiratory illnesses*. Clin Infect Dis. 2003; 36(3):328–336; DOI: 10.1086/346035.
280. Kurniawan A., Wahyuni A. R. T., et al. *Harnessing Bacillus cereus from Surabaya seawater for enhanced diesel fuel bioremediation in Tropical Ocean*. Trends in Sciences. 2024; 21(7):7616; DOI: 10.48048/tis.2024.7616.

281. Kuroki R., Kawakami K., et al. Nosocomial bacteremia caused by biofilm-forming *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Intern Med.* 2009; 48(10):791–796; DOI: 10.2169/internalmedicine.48.1885.
282. Lablaine A., Serrano M., et al. The morphogenetic protein CotE positions exosporium proteins CotY and ExsY during sporulation of *Bacillus cereus*. *mSphere.* 2021; 6(2):e00007–21; DOI: 10.1128/mSphere.00007–21.
283. *Laboratory biosafety manual.* 3rd ed. World Health Organization, WHO/CDS/CSR/LYO/2004.11, 2004, 181 p.
284. Lawrence W. S., Peel J. E., et al. Teixobactin provides protection against inhalation Anthrax in the rabbit model. *Pathogens.* 2020; 9(9):773; DOI: 10.3390/pathogens9090773.
285. Lechner S., Mayr R., et al. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *Int J Syst Bacteriol.* 1998; 4:1373–1382; DOI: 10.1099/00207713-48-4-1373.
286. Leendertz F. H., Ellerbrok H., et al. Anthrax kills wild chimpanzees in a tropical rainforest. *Nature.* 2004; 430(6998):451–452; DOI: 10.1038/nature02722.
287. Leendertz F. H., Lankester F., et al. Anthrax in Western and Central African great apes. *Am J Primatol.* 2006; 68(9):928–933; DOI: 10.1002/ajp.20298.
288. Leendertz F. H., Yumlu S., et al. A New *Bacillus anthracis* found in wild Chimpanzees and a Gorilla from West and Central Africa. *PLoS Pathog.* 2006; 2(1):e8; DOI: 10.1371/journal.ppat.0020008.
289. Lehmann D., Sladek M., et al. Role of novel polysaccharide layers in assembly of the exosporium, the outermost protein layer of the *Bacillus anthracis* spore. *Mol Microbiol.* 2022; 118(3):258–277; DOI: 10.1111/mmi.14966.
290. Lekota K. E., Hassim A., et al. *Bacillus anthracis* in South Africa, 1975–2013: are some lineages vanishing? *BMC Genomics.* 2024; 25:742; DOI: 10.1186/s12864-024-10631-5.
291. Lekota K. E., Hassim A., et al. Phylogenomic structure of *Bacillus anthracis* isolates in the Northern Cape Province, South Africa revealed novel single nucleotide polymorphisms. *Infect Genet Evol.* 2020; 80:104146; DOI: 10.1016/j.meegid.2019.104146.
292. Lekota K. E., Hassim A., et al. The reporting of a *Bacillus anthracis* B-clade strain in South Africa after more than 20 years. *BMC Res Notes.* 2018; 11:264; DOI: 10.1186/s13104-018-3366-x.
293. Li J., Che Y., et al. *Bacillus tropicus* YJ33 and *Medicago sativa* L. synergistically enhance soil aggregate stability in saline-alkali environments. *Microorganisms.* 2025; 13(6):1291; DOI: 10.3390/microorganisms13061291.
294. Li Y. L., Zhang H. Q., et al. Isolation and identification of pathogen causing “head-shaking syndrome” of *Pelodiscus sinensis nigrum* and drug susceptibility analysis. *Oceanol. Limnol. Sin.* 2020; 51:405–414.
295. Liang X., Zhang H., et al. Identification of the pXO1 plasmid in attenuated *Bacillus anthracis* vaccine strains. *Virulence.* 2016; 7(5):578–586; DOI: 10.1080/21505594.2016.1164366.
296. Little S. F., Ivins B. E. Molecular pathogenesis of *Bacillus anthracis* infection. *Microbes Infect.* 1999; 1(2):131–139; DOI: 10.1016/s1286-4579(99)80004-5.
297. Liu P., Long H., et al. Highly-efficient synthesis of biogenic selenium nanoparticles by *Bacillus paramycoides* and their antibacterial and antioxidant activities. *Front Bioeng Biotechnol.* 2023; 11:1227619; DOI: 10.3389/fbioe.2023.1227619.

298. Liu X., Qi X., et al. *Genome sequence of Bacillus anthracis attenuated vaccine strain A16R used for human in China*. J Biotechnol. 2015; 210:15-16; DOI: 10.1016/j.jbiotec.2015.06.408.
299. Liu Y., Lai Q., et al. *Genome analysis-based reclassification of Bacillus weihenstephanensis as a later heterotypic synonym of Bacillus mycoides*. Int J Syst Evol Microbiol. 2018; 68(1):106-112; DOI: 10.1099/ijsem.0.002466.
300. Liy Y., Du J., et al. *Proposal of nine novel species of the Bacillus cereus group*. Int J Syst Evol Microbiol. 2017; 67(8):2499-2508; DOI: 10.1099/ijsem.0.001821.
301. Low L.-Y., Yang C., et al. *Structure and lytic activity of a Bacillus anthracis prophage endolysin*. J Biol Chem. 2005; 280(42):35433-35439; DOI: 10.1074/jbc.M502723200.
302. Luna V. A., King D. S., et al. *Bacillus anthracis virulent plasmid pX02 genes found in large plasmids of two other Bacillus species*. J Clin Microbiol. 2006; 44(7):2367-2377; DOI: 10.1128/JCM.00154-06.
303. Lund T., de Buyser M. L., et al. *A new cytotoxin from Bacillus cereus that may cause necrotic enteritis*. Mol Microbiol. 2000; 38(2):254-261; DOI: 10.1046/j.1365-2958.2000.02147.x.
304. Lund T., Granum P. E. *Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from Bacillus cereus isolated after a foodborne outbreak*. FEMS Microbiol Lett. 1996; 141(2-3):151-156; DOI: 10.1111/j.1574-6968.1996.tb08377.x.
305. Luo J.-C., Long H., et al. *Characterization of a Deep Sea Bacillus toyonensis isolate: genomic and pathogenic features*. Front Cell Infect Microbiol. 2021; 11:629116; DOI: 10.3389/fcimb.2021.629116.
306. M'Fadyean J. *A peculiar staining reaction of the blood of animals dead of anthrax*. J Comp Pathol Ther. 1903; 15:35-IN1.
307. Ma W., Ding J., et al. *A novel strain of Bacillus cereus with a strong antagonistic effect specific to Sclerotinia and its genomic and transcriptomic analysis*. Microorganisms. 2024; 12(3):611; DOI: 10.3390/microorganisms12030611.
308. Mabry R., Brasky K., et al. *Detection of Anthrax toxin in the serum of animals infected with Bacillus anthracis by using engineered immunoassays*. Clin Vaccine Immunol. 2006; 13(6):671-677; DOI: 10.1128/CVI.00023-06.
309. Machen A. J., Fisher M. T., et al. *Anthrax toxin translocation complex reveals insight into the lethal factor unfolding and refolding mechanism*. Sci Rep. 2021; 11:13038; DOI: 10.1038/s41598-021-91596-3.
310. Mahler H., Pasi A., et al. *Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of Bacillus cereus*. N Engl J Med. 1997; 336(16):1142-1148; DOI: 10.1056/NEJM199704173361604.
311. Mamatkulova N. M., Zholdoshev S. T., et al. *A case study on anthrax in an eight-month old infant at Kyrgyz Republic*. Bioinformatics. 2024; 20(3):301-304; DOI: 10.6026/973206300200301.
312. Manoharan S., Taylor-Joyce G., et al. *From cereus to anthrax and back again: Assessment of the temperature-dependent phenotypic switching in the "cross-over" strain Bacillus cereus G9241*. Front Microbiol. 2023; 14:1113562; DOI: 10.3389/fmicb.2023.1113562.
313. Marchoux É. *Sérum anticharbonneux*. Ann. Inst. Pasteur. 1895; 9:785-810.
314. Marongiu A., Hasan O., et al. *Are welders more at risk of respiratory infections? Findings from a cross-sectional survey and analysis of medical records in shipyard workers: the WELSHIP project*. Thorax. 2016; 71(7):601-606; DOI: 10.1136/thoraxjnl-2015-207912.

315. Mattes O. *Parasitäre Krankheiten der Mehlmottenlarven und Versuche über ihre Verwendbarkeit als biologische Bekämpfungsmittel*. SitzB. Ges. Beförd. ges. Naturwissensch. Marburg. 1927; 62:381–417.
316. Mayer-Scholl A., Hurwitz R., et al. *Human neutrophils kill Bacillus anthracis*. PLoS Pathog. 2005; 1(3):e23; DOI: 10.1371/journal.ppat.0010023.
317. Mayo L., Dionne-Odom J., et al. *Gastrointestinal anthrax after an animal-hide drumming event – New Hampshire and Massachusetts, 2009*. MMWR. 2010; 59(28):872–877.
318. McCloy E. W. *Lysogenicity and immunity to Bacillus phage W*. J Gen Microbiol. 1958; 18(1):198–220; DOI: 10.1099/00221287-18-1-198.
319. McCloy E. W. *Studies on a lysogenic Bacillus strain. I. A bacteriophage specific for B. anthracis*. J Hygiene. 1951; 49(2):114–125; DOI: 10.1017/s0022172400015412.
320. McCloy E. W. *Unusual behaviour of a lysogenic Bacillus strain*. J Gen Microbiol. 5:xiv-xvi.
321. McFarland J. *The nephelometer: an instrument for estimating the numbers of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and vaccines*. J Am Med Assoc. 1907; 49:1176–1178.
322. McKinley T., Burnham B., et al. *Surely you can't B. cereus: Bacillus cereus infection resulting in spontaneous pseudoaneurysm of a nonaccessed arteriovenous graft*. J Vasc Surg Cases Innov Tech. 2023; 9(4):101333; DOI: 10.1016/j.jvscit.2023.101333.
323. Meaney-Delman D., Zotti M. E., et al. *Anthrax cases in pregnant and postpartum women: a systematic review*. Obstet Gynecol. 2012; 120(6):1439–1449; DOI: 10.1097/aog.0b013e318270ec08.
324. Meaney-Delman D., Zotti M. E., et al. *Special considerations for prophylaxis for and treatment of anthrax in pregnant and postpartum women*. Emerg Infect Dis. 2014; 20(2):e130611; DOI: 10.3201/eid2002.130611.
325. Melling J., Capel B. J., et al. *Identification of a novel enterotoxigenic activity associated with Bacillus cereus*. J Clin Pathol. 1976; 29(10):938–940; DOI: 10.1136/jcp.29.10.938.
326. Méric G., Mageiros L., et al. *Lineage-specific plasmid acquisition and the evolution of specialized pathogens in Bacillus thuringiensis and the Bacillus cereus group*. Mol Ecol. 2018; 27(7):1524–1540; DOI: 10.1111/mec.14546.
327. Meselson M., Guillemin J., et al. *The Sverdlovsk anthrax outbreak of 1979*. Science. 1994; 266(5188):1202–128; DOI: 10.1126/science.7973702.
328. Mesnage S., Tosi-Couture E., et al. *The capsule and S-layer: two independent and yet compatible macromolecular structures in Bacillus anthracis*. J Bacteriol. 1998; 180(1):52–58; DOI: 10.1128/jb.180.1.52-58.1998.
329. Mignot T., Mesnage S. et al. *Developmental switch of S-layer protein synthesis in Bacillus anthracis*. Mol Microbiol. 2002; 43(6):1615–1627; DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.02852.x.
330. Mignot T., Mock M., et al. *The incompatibility between the PlcR- and AtxA-controlled regulons may have selected a nonsense mutation in Bacillus anthracis*. Mol Microbiol. 2001; 42(5):1189–1198; DOI: 10.1046/j.1365-2958.2001.02692.x.
331. Mikesell P., Ivins B. E., et al. *Evidence for plasmid-mediated toxin production in Bacillus anthracis*. Infect Immun. 1983; 39(1):371–376; DOI: 10.1128/iai.39.1.371-376.1983.

332. Milase R. N., Lin J., et al. *Reclassification of the first Bacillus tropicus phage calls for reclassification of other Bacillus temperate phages previously designated as plasmids.* BMC Genomics. 2024; 25:1018; DOI: 10.1186/s12864-024-10937-4.
333. Miller J. M., Hair J. G., et al. *Fulminating bacteremia and pneumonia due to Bacillus cereus.* J Clin Microbiol. 1997; 35(2):504-507; DOI: 10.1128/jcm.35.2.504-507.1997.
334. Mishra P. C., Mishra S., et al. *Coinoculation of Bacillus thuringiensis-KR1 with Rhizobium leguminosarum enhances plant growth and nodulation of pea (Pisum sativum L.) and lentil (Lens culinaris L.).* World J Microbiol Biotechnol. 2009; 25:753-761; DOI: 10.1007/s11274-009-9963-z.
335. Missiakas D., Schneewind O. *Assembly and Function of the Bacillus anthracis S-Layer.* Annu Rev Microbiol. 2017; 71:79-98; DOI: 10.1146/annurev-micro-090816-093512.
336. Moayeri M., Leppla S. H., et al. *Anthrax Pathogenesis.* Annu Rev Microbiol. 2015; 69:185-208; DOI: 10.1146/annurev-micro-091014-104523.
337. Moctezuma K., Acevedo H. D., et al. *Enterotoxemia in a 2-day-old lamb produced by a Clostridium perfringens type D lambda toxin-positive strain.* J Vet Diagn Invest. 2025; 27:10406387251320943; DOI: 10.1177/10406387251320943.
338. Moorhead R. *William Budd and typhoid fever.* JRSM. 2002; 95(11):561-564; DOI: 10.1258/jrsm.95.11.561
339. Morens D. M. *Characterizing a "new" disease: Epizootic and epidemic Anthrax, 1769-1780.* Am J Public Health. 2003; 93(6):886-893; DOI: 10.2105/ajph.93.6.886
340. Morens D. M. *Epidemic Anthrax in the Eighteenth Century, the Americas.* Emerg Infect Dis. 2002; 8(10):1160-1162; DOI: 10.3201/eid0810.020173
341. Mortimer P. R., McCann G. *Food-poisoning episodes associated with Bacillus cereus in fried rice.* Lancet. 1974; 1(7865):1043-1045; DOI: 10.1016/s0140-6736(74)90434-6.
342. Mosser E. M., Rest R. F. *The Bacillus anthracis cholesterol-dependent cytolysin, Anthrolysin O, kills human neutrophils, monocytes and macrophages.* BMC Microbiol. 2006; 6:56; DOI: 10.1186/1471-2180-6-56.
343. Mursalin M. H., Livingston E. T., et al. *The cereus matter of Bacillus endophthalmitis.* Exp Eye Res. 2020; 193:107959; DOI: 10.1016/j.exer.2020.107959.
344. Naclerio G., Ricca E., et al. *Antimicrobial activity of a newly identified bacteriocin of Bacillus cereus.* Appl Environ Microbiol. 1993; 59(12):4313-4316; DOI: 10.1128/aem.59.12.4313-4316.1993.
345. Nakamura L. K. *Bacillus pseudomycoloides sp. nov.* Int J Syst Bacteriol. 1998; 48(3):1031-5; DOI: 10.1099/00207713-48-3-10.
346. Narsana N., Farhat F. *Septic shock due to Pasteurella multocida bacteremia: a case report.* J Med Case Rep. 2015; 9:159; DOI: 10.1186/s13256-015-0643-3.
347. Negus D., Burton J., et al. *Poly- γ -(D)-glutamic acid capsule interferes with lytic infection of Bacillus anthracis by B. anthracis-specific bacteriophages.* Appl Environ Microbiol. 2013; 79(2):714-717; DOI: 10.1128/AEM.02682-12.
348. Norris M. H., Bluhm A. P., et al. *Beyond the spore, the exosporium sugar anthrose impacts vegetative Bacillus anthracis gene regulation in cis and trans.* Sci Rep. 2023; 13:5060; DOI: 10.1038/s41598-023-32162-x.
349. Norris M. H., Kirpich A., et al. *Convergent evolution of diverse Bacillus anthracis outbreak strains toward altered surface oligosaccharides that modulate anthrax pathogenesis.* PLoS Biol. 2020; 18(12):e3001052; DOI: 10.1371/journal.pbio.3001052.

350. Norris M. H., Zincke D., et al. *Genomic and phylogenetic analysis of Bacillus cereus biovar anthracis isolated from archival bone samples reveals earlier natural history of the pathogen.* Pathogens 2023; 12(8):1065; DOI: 10.3390/pathogens12081065.
351. O'Brien D. K., Ribot W. J., et al. *The capsule of Bacillus anthracis protects it from the bactericidal activity of human defensins and other cationic antimicrobial peptides.* PLoS Pathog. 2022; 18(9):e1010851; DOI: 10.1371/journal.ppat.1010851.
352. Oh S. Y., Chateau A., et al. *Modeling gastrointestinal anthrax disease.* Res Microbiol. 2023; 174(6):104026; DOI: 10.1016/j.resmic.2023.104026.
353. Oh S.-Y., Budzik J. M., et al. *Two capsular polysaccharides enable Bacillus cereus G9241 to cause anthrax-like disease.* Mol Microbiol. 2011; 80(2):455–470; DOI: 10.1111/j.1365-2958.2011.07582.x.
354. Okinaka R. T., Cloud K., et al. *Sequence and organization of pXO1, the large Bacillus anthracis plasmid harboring the anthrax toxin genes.* J Bacteriol. 1999; 181(20):6509–6515; DOI: 10.1128/jb.181.20.6509–6515.1999.
355. Okinaka R. T., Henrie M., et al. *Single nucleotide polymorphism typing of Bacillus anthracis from Sverdlovsk tissue.* Emerg Infect Dis. 2008; 14(4):653–656; DOI: 10.3201/eid1404.070984.
356. Økstad O. A., Hegna I., et al. *Genome organization is not conserved between Bacillus cereus and Bacillus subtilis.* Microbiology (Reading). 1999; 145 (Pt 3):621–631; DOI: 10.1099/13500872-145-3-621.
357. Okutani A., Tungalag H., et al. *Molecular epidemiological study of Bacillus anthracis isolated in Mongolia by multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for 8 loci (MLVA-8).* Jpn J Infect Dis. 2011; 64(4):345–348.
358. Olani A., Galante D., et al. *Identification of Bacillus anthracis strains from animal cases in Ethiopia and genetic characterization by whole-genome sequencing.* Pathogens. 2025; 14(1):39; DOI: 10.3390/pathogens14010039.
359. Olsufev N. G., Leler P. P. *On the importance of tabanids in the spread of anthrax,* in Parasites Transmitters anim. venimaux. Rec. Trav. 25th Anniv. Sci. Pavlovsky 1909–1934 (Applied Entomology, 1936; 24:177–179).
360. Orozova P., Sikarov I., et al. *Recovery of Bacillus mycoides, B. pseudomycoides and Aeromonas hydrophila from common carp (Cyprinus carpio) and rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) with gill disease.* J Fish Dis. 2018; 41(1):125–129; DOI: 10.1111/jfd.12686.
361. Ouchterlony Ö. *Antigen - antibody reactions in gel.* Acta Pathol Microbiol Scand. 1949; 26(4):507–515; DOI: 10.1111/j.1699-0463.1949.tb00751.x.
362. Ozdemir H., Demirdag K., et al. *Anthrax of the gastrointestinal tract and oropharynx: CT findings.* Emerg Radiol. 2010; 17:161–164; DOI: 10.1007/s10140-009-0821-y.
363. Pannucci J., Okinaka R. T., et al. *Bacillus anthracis pXO1 plasmid sequence conservation among closely related bacterial species.* J Bacteriol. 2002; 184(1):134–141; DOI: 10.1128/JB.184.1.134–141.2002.
364. Pannucci J., Okinaka R. T., et al. *DNA sequence conservation between the Bacillus anthracis pXO2 plasmid and genomic sequence from closely related bacteria.* BMC Genomics. 2002; 3:34; DOI: 10.1186/1471-2164-3-34.
365. Paolino K. M., Regules J. A., et al. *Safety and immunogenicity of a plant-derived recombinant protective antigen (rPA)-based vaccine against Bacillus anthracis: A Phase 1 dose-*

- escalation study in healthy adults. *Vaccine*. 2022; 40(12):1864–1871; DOI: 10.1016/j.vaccine.2022.01.047.
366. Park H., Lee C. S., et al. *Bacillus cereus endophthalmitis in a child with hemophilia: a case report*. *Korean J Ophthalmol*. 2024; 38(4):327–329; DOI: 10.3341/kjo.2024.0058.
367. Park S., Jun S. Y., et al. *Characterisation of the antibacterial properties of the recombinant phage endolysins AP50–31 and LysB4 as potent bactericidal agents against Bacillus anthracis*. *Sci Rep*. 2018; 8(1):18; DOI: 10.1038/s41598-017-18535-z.
368. Pasteur L., Chamberland C., Roux E. *Compte rendu sommaire des expériences faites à Pouilly-le-Fort, près Melun, sur la vaccination charbonneuse*. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences*; 1881; XCII:1378–1383.
369. Paul G. K., Mahmud S., et al. *Volatile compounds of Bacillus pseudomycoides induce growth and drought tolerance in wheat (Triticum aestivum L.)*. *Sci Rep*. 2022; 12(1):19137; DOI: 10.1038/s41598-022-22354-2.
370. Petosa C., Collier R. J., et al. *Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen*. *Nature*. 1997; 385:833–838; DOI: 10.1038/385833a0.
371. Pilo P., Rossano A., et al. *Bovine Bacillus anthracis in Cameroon*. *Appl Environ Microbiol*. 2011; 77(16):5818–5821. DOI: 10.1128/AEM.00074-11.
372. Pisarenko S. V., Eremenko E. I., et al. *Molecular genotyping of 15 B. anthracis strains isolated in Eastern Siberia and Far East*. *Mol Phylogenet Evol*. 2021; 159:107116; DOI: 10.1016/j.ympev.2021.107116.
373. Pisarenko S. V., Eremenko E. I., et al. *Phylogenetic analysis of Bacillus anthracis strains from Western Siberia reveals a new genetic cluster in the global population of the species*. *BMC Genomics*. 2019; 20:692; DOI: 10.1186/s12864-019-6060-z.
374. Plaut R. D., Beaber J. W., et al. *Genetic evidence for the Involvement of the S-layer protein gene sap and the sporulation genes spo0A, spo0B, and spo0F in phage AP50c infection of Bacillus anthracis*. *J Bacteriol*. 2014; 196(6):1143–1154; DOI: 10.1128/JB.00739-13.
375. Pollender A. *Mikroskopische und mikrochemische Untersuchung des Milzbrandblutes, so wie über Wesen und Kur des Milzbrandes*. *Vierteljahrsschrift für gerichtliche und öffentliche Medicin*. 1855; 8:103–114.
376. Popescu C. P., Zaharia M., et al. *Anthrax meningoencephalitis complicated with brain abscess – A case report*. *Int J Infect Dis*. 2021; 108:217–219; DOI: 10.1016/j.ijid.2021.05.013.
377. Popova T. G., Espina V., et al. *Whole proteome analysis of mouse lymph nodes in cutaneous anthrax*. *PLoS One*. 2014; 9(10):e110873; DOI: 10.1371/journal.pone.0110873.
378. Popova T. G., Millis B., et al. *Anthrolysin O and fermentation products mediate the toxicity of Bacillus anthracis to lung epithelial cells under microaerobic conditions*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2010; 61(1):15–27; DOI: 10.1111/j.1574-695X.2010.00740.x.
379. Powell A. G. M. T., Crozier J. E. M., et al. *A case of septicaemic anthrax in an intravenous drug user*. *BMC Infect Dis*. 2011; 11:21; DOI: 10.1186/1471-2334-1121.
380. Price E. P., Seymour M. L., et al. *Molecular Epidemiologic Investigation of an Anthrax Outbreak among Heroin Users, Europe*. *Emerg Infect Dis*. 2012; 18(8):1307–1313; DOI: 10.3201/eid1808.111343.
381. Priest F. G., Barker M., et al. *Population structure and evolution of the Bacillus cereus group*. *J Bacteriol*. 2004; 186(23):7959–7970; DOI: 10.1128/JB.186.23.7959-7970.2004.

382. Rajesh A., Hariny V. S., et al. *Performance of Bacillus tropicus on mechanical, durable and crack remediation properties in sustainable vermiculite concrete*. J Bionic Eng. 2024; 21:1987–1999; DOI: 10.1007/s42235-024-00546-y.
383. Rampersad J., Khan A., et al. *Usefulness of staining parasporal bodies when screening for Bacillus thuringiensis*. J Invert Pathol. 2002; 79(3):203–204; DOI: 10.1016/s0022-2011(02)00018-6.
384. Rasko D. A., Worsham P. L., et al. *Bacillus anthracis comparative genome analysis in support of the Amerithrax investigation*. PNAS. 2011; 108(12):5027–5032; DOI: 10.1073/pnas.1016657108.
385. Rayer M. *Inoculation du sang de rate*. Comptes rendus des séances et mémoires de la Société de Biologie. 1850; 2:141–144.
386. Read T. D., Salzberg S. L., et al. *Comparative genome sequencing for discovery of novel polymorphisms in Bacillus anthracis*. Science. 2002; 296(5575):2028–2033; DOI: 10.1126/science.1071837.
387. Ren J., Wang C., et al. *Biodegradation of acephate by Bacillus paramycoides NDZ and its degradation pathway*. World J Microbiol Biotechnol. 2020; 36:155; DOI: 10.1007/s11274-020-02931-1.
388. *Review of the Scientific Approaches Used During the FBI's Investigation of the 2001 Anthrax Letters*, National Academies Press, 2011, 210 p.; DOI: 10.17226/13098.
389. Riedel S. *Anthrax: a continuing concern in the era of bioterrorism*. Proc (Bayl Univ Med Cent). 2005; 18(3):234–243; DOI: 10.1080/08998280.2005.11928074.
390. Ringertz S. H., Høiby E. A., et al. *Injectional anthrax in a heroin skin-popper*. Lancet. 2000; 356(9241):1574–1575; DOI: 10.1016/s0140-6736(00)03133-0.
391. Robillard N. J., Koehler T. M., et al. *Plasmid pBAI-mediated toxin production in Bacillus anthracis cells*. Abstr. Annu Meet Amer Soc Microbiol. 1983; H54:115.
392. Rocha F. Y. O., Júnior A. S. N., et al. *Endophytic Bacillus bacteria living in sugarcane plant tissues and Telchin licus licus Larvae (Drury) (Lepidoptera: Castniidae): the symbiosis that may open new paths in the biological control*. Front Microbiol. 2021; 12:659965; DOI: 10.3389/fmicb.2021.659965.
393. Romanenko M. N., Shikov A. E., et al. *Genomic insights into the bactericidal and fungicidal potential of Bacillus mycoides b12.3 isolated in the Soil of Olkhon Island in Lake Baikal, Russia*. Microorganisms 2024; 12(12):2450; DOI: 10.3390/microorganisms12122450.
394. Rooney, A., Majumder S., et al. *Molecular characterization of B. anthracis isolates from the anthrax outbreak among cattle in Karnataka, India*. BMC Microbiol. 2020; 20:232; DOI: 10.1186/s12866-020-01917-1.
395. Rose L., Jensen B., et al. *Swab materials and Bacillus anthracis spore recovery from nonporous surfaces*. Emerg Infect Dis. 2004; 10(6):1023–1029; DOI: 10.3201/eid1006.030716.
396. Rousset L., Alpha-Bazin B., et al. *Groundwater promotes emergence of asporogenic mutants of emetic Bacillus cereus*. Environ Microbiol. 2020; 22(12):5248–5264; DOI: 10.1111/1462-2920.15203.
397. Rudd S. R., Miranda L.S., et al. *The parasporal body of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis: a unique phage capsid-associated prokaryotic insecticidal organelle*. Biology (Basel). 2023; 12(11):1421; DOI: 10.3390/biology12111421.

398. Russell L., Pedersen M., et al. *Two anthrax cases with soft tissue infection, severe oedema and sepsis in Danish heroin users*. BMC Infect Dis. 2013; 13:408; DOI: 10.1186/1471-2334-13-408.
399. Saile E., Koehler T. M. *Bacillus anthracis multiplication, persistence, and genetic exchange in the rhizosphere of grass plants*. Appl Environ Microbiol. 2006; 72(5):3168-3174; DOI: 10.1128/AEM.72.5.3168-3174.2006.
400. Samanta S., Datta D., et al. *Biodegradation efficacy of soil inherent novel sp. Bacillus tropicus (MK318648) onto low density polyethylene matrix*. J Polym Res. 2020; 27:324; DOI: 10.1007/s10965-020-02296-x.
401. Sastry K. S. R., Tuteja U., et al. *Identification of Bacillus anthracis by a simple protective antigen-specific mAb dot-ELISA*. J Med Microbiol. 2003; 52(Pt 1):47-49; DOI: 10.1099/jmm.0.05027-0.
402. Sato K., Ichiyama S., et al. *A case of urinary tract infection caused by Bacillus cereus*. J Infect. 1998; 36(2):247-248; DOI: 10.1016/s0163-4453(98)80032-7.
403. Chamber G. J., Berg I. E., et al. *Braxy or Bradsot-like abomasitis caused by Clostridium septicum in a calf*. Can Vet J. 1986; 27(4):194.
404. Schuberger A., Kuhn M. *Ueber die Uebertragung von Krankheiten durch einheimische stechende insekten*. Arb. a. d. kais. Gesundheitsamt. 1912; 40(2):209-234.
405. Sclavo A. *Sulla preparazione del siero anticarbonchioso (memoria 2.)*. Roma: Tipog. delle Mantellate, 1895, 5 p.
406. Selim K. A., Rostom M. *Bioflocculation of (Iron oxide - Silica) system using Bacillus cereus bacteria isolated from Egyptian iron ore surface*. Egyptian Journal of Petroleum. 2018; 27(2):235-240; DOI: 10.1016/j.ejpe.2017.07.002.
407. Sen S. K., Minett F. C. *Experiments on the transmission of anthrax through flies*. Ind J Vet Sci. 1944; 14:149-159.
408. Setlow P. *Germination of spores of Bacillus species: what we know and do not know*. J Bacteriol. 2014; 196(7):1297-1305; DOI: 10.1128/JB.01455-13.
409. Shahcheraghi S. H., Ayatollahi J. *pXO1-and pXO2-like Plasmids in Bacillus cereus and B. thuringiensis*. Jundishapur Journal Of Microbiology. 2013; 6(10):e8482.
410. Sharma S., Bhatnagar R., et al. *Bacillus anthracis poly-γ-D-glutamate capsule inhibits opsonic phagocytosis by impeding complement activation*. Front Immunol. 2020; 11:462; DOI: 10.3389/fimmu.2020.00462.
411. Shatterjee S., Shatterjee S., et al. *Mersacidin, a new antibiotic from Bacillus. Fermentation, isolation, purification and chemical characterization*. J Antibiot (Tokyo). 1992; 45(6):832-838; DOI: 10.7164/antibiotics.45.832.
412. Shearer J. D., Henning L., et al. *Efficacy of the AV7909 anthrax vaccine candidate in guinea pigs and nonhuman primates following two immunizations two weeks apart*. Vaccine. 2021; 39(1):1-5; DOI: 10.1016/j.vaccine.2020.10.095.
413. Shibano Y., Yamagata A., et al. *Nucleotide sequence coding for the insecticidal fragment of the Bacillus thuringiensis crystal protein*. Gene. 1985; 34(2-3):243-251; DOI: 10.1016/0378-1119(85)90133-7.
414. Shlyakhov E. N., Rubinstein E. *Human live anthrax vaccine in the former USSR*. Vaccine. 1994; 12(8):727-730; DOI: 10.1016/0264-410X(94)90223-2.
415. Sirisanthana T., Brown A. E. *Anthrax of the gastrointestinal tract*. Emerg Infect Dis. 2002; 8(7):649-651; DOI: 10.3201/eid0807.020062.

416. Sirisanthana T., Navachareon N., et al. *Outbreak of oral-pharyngeal anthrax: an unusual manifestation of human infection with Bacillus anthracis*. *Am J Trop Med Hyg*. 1984; 33(1):144–150; DOI: 10.4269/ajtmh.1984.33.144.
417. Sittner A., Bar-David E., et al. *Closing the gaps: testing the efficacy of carbapenem and cephalosporin treatments of late-stage Anthrax in rabbits*. *Pathogens*. 2024; 13(11):936; DOI: 10.3390/pathogens13110936.
418. Smith H., Keppie J. et al. *The chemical basis of the virulence of Bacillus anthracis. V. The specific toxin produced by B. anthracis in vivo*. *Br J Exp Pathol*. 1955; 36:460–472.
419. Smith H., Keppie J. *Observations on Experimental Anthrax: Demonstration of a Specific Lethal Factor produced in vivo by Bacillus anthracis*. *Nature*. 1954; 173:869–870; DOI: 10.1038/173869a0.
420. Smith V., Josefsen M., et al. *MogR is a ubiquitous transcriptional repressor affecting motility, biofilm formation and virulence in Bacillus thuringiensis*. *Front Microbiol*. 2020; 11:610650; DOI: 10.3389/fmicb.2020.610650.
421. Song Z., Zhao Q., et al. *Draft genome sequence of multidrug-resistant β -lactamase-producing Bacillus cereus S66 isolated from China*. *J Glob Antimicrob Resist*. 2019; 17:23–24; DOI: 10.1016/j.jgar.2019.02.019.
422. Soufiane B., Baizet M., et al. *Multilocus sequence analysis of Bacillus thuringiensis serovars navarrensis, bolivia and vazensis and Bacillus weihenstephanensis reveals a common phylogeny*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2013; 103(1):195–205; DOI: 10.1007/s10482-012-9800-5.
423. Soufiane B., Côté J.-C. *Bacillus weihenstephanensis characteristics are present in Bacillus cereus and Bacillus mycoides strains*. *FEMS Microbiol Lett*. 2013; 341(2):127–137; DOI: 10.1111/1574-6968.12106.
424. Soufiane B., Sirois M., et al. *Mutually exclusive distribution of the sap and eag S-layer genes and the lytB/lytA cell wall hydrolase genes in Bacillus thuringiensis*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2011; 100(3):349–364.; DOI: 10.1007/s10482-011-9590-1.
425. Splino M., Patocka J., et al. *Anthrax vaccines*. *Ann Saudi Med*. 2005; 25(2):143–149; DOI: 10.5144/0256-4947.2005.143.
426. Sprengle M. D., Griffith J., et al. *Lethal factor and anti-protective antigen IgG levels associated with inhalation anthrax, Minnesota, USA*. *Emerg Infect Dis*. 2014; 20(2):310–314; DOI: 10.3201/eid2002.130245.
427. Stamatin N. Stamatin L. *Le pouvoir immunisant de souches acapsulogènes du B. anthracis*. *C R Soc Biol*. 1936; 122:491–493.
428. Stark J. F. *The making of modern Anthrax, 1875–1920: Uniting Local, National, and Global Histories of Disease*. Science and Culture in the Nineteenth Century, no. 21. London: Pickering & Chatto, 2013. xi + 251 pp.
429. Sternbach G. *The history of anthrax*. *J Emerg Med*. 2003; 24(4):463–467; DOI: 10.1016/S0736-4679(03)00079-9.
430. Sterne M. *The use of anthrax vaccines prepared from avirulent (uncapsulated) variants of Bacillus anthracis*. *Onderstepoort J Vet Sci Anim Ind*. 1939; 13:307–312.
431. Stevens D. L., Musher D. M., et al. *Spontaneous, nontraumatic gangrene due to Clostridium septicum*. *Rev Infect Dis*. 1990; 12(2):286–296; DOI: 10.1093/clinids/12.2.286.

432. Stewart G. G. *The exosporium layer of bacterial spores: a connection to the environment and the infected host*. Microbiol Mol Biol Rev. 2015; 79(4):437–457; DOI: 10.1128/MMBR.00050-15.
433. Stratford J. P., Woodley M. A., et al. *Variation in the morphology of Bacillus mycoides due to applied force and substrate structure*. PLoS One. 2013; 8(12):e81549; DOI: 10.1371/journal.pone.0081549.
434. Suffin S. C., Carnes W. H., et al. *Inhalation anthrax in a home craftsman*. Hum Pathol. 1978; 9(5):594–597; DOI: 10.1016/s0046-8177(78)80140-3.
435. Sweeney D. A., Hicks C. W., et al. *Anthrax infection*. Am J Respir Crit Care Med. 2011; 184(12):1333–1341; DOI: 10.1164/rccm.201102-0209CI.
436. Swiecicka I. *Natural occurrence of Bacillus thuringiensis and Bacillus cereus in eukaryotic organisms: a case for symbiosis*. Biocontrol Science and Technology. 2008; 18(3):121–239; DOI: 10.1080/09583150801942334.
437. Swiecicka I., Mahillon J. *Diversity of commensal Bacillus cereus sensu lato isolated from the common sow bug (Porcellio scaber, Isopoda)*. FEMS Microbiol Ecol. 2006; 56(1):132–140; DOI: 10.1111/j.1574-6941.2006.00063.x.
438. *Symposium in Memoriam Dr. Ernst Berliner anlässlich des 75. Jahrestages der Erstbeschreibung von Bacillus thuringiensis : Darmstadt, 25. Aug. 1986 bearbeitet von Dr. A. Krieg und Dr. A. M. Huger*, Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem. 1986; 233, 111 p.; DOI: 10.5073/20210628-103818.
439. Tamura Y., Kijima M., et al. *Partial characterization of the hemolysin produced by Clostridium chauvoei*. J Vet Med Sci. 1992; 54(4):777–778; DOI: 10.1292/jvms.54.777.
440. Tan A.-P., Zhao F., et al. *Isolation and Identification of Bacillus cereus from Trionyx sinensis*. Guangdong Agric Sci. 2011; 20:115–119.
441. Tao Z., Xu J., et al. *Infectious diseases of the Chinese soft-shelled turtle (Pelodiscus sinensis): A focus on etiological agents and predisposing factors*. Aquaculture Reports. 2024; 37:102227; DOI: 10.1016/j.aqrep.2024.102227.
442. Taylor-Joyce G., Manoharan S., et al. *The influence of extrachromosomal elements in the anthrax “cross-over” strain Bacillus cereus G9241*. Front Microbiol. 2023; 14:1113642; DOI: 10.3389/fmicb.2023.1113642.
443. Teleke Kaymaz S., Cetin F. T., et al. *A rare presentation of Anthrax: a pediatric patient with palpebral Anthrax*. Med Bull Sisli Etfal Hosp. 2024; 58(1):127–130; DOI: 10.14744/SEMB.2023.51261.
444. Tettelin H., Riley D., et al. *Comparative genomics: the bacterial pan-genome*. Curr Opin Microbiol. 2008; 11(5):472–277; DOI: 10.1016/j.mib.2008.09.006.
445. Thierry S., Tourterel C., et al. *Genotyping of French Bacillus anthracis strains based on 31-loci multi locus VNTR Analysis: epidemiology, marker evaluation, and update of the internet genotype database*. PLoS One. 2014; 9(6):e95131; DOI: 10.1371/journal.pone.0095131.
446. Thomassin J.-F. *Dissertation sur la charbon malin de la Bourgogne, ou la pustule maligne*. Dijon: Antoine Benoit; 1780.
447. Thompson B. M., Waller L. N., et al. *The BclB Glycoprotein of Bacillus anthracis is involved in exosporium integrity*. J Bacteriol. 2007; 189(18):6704–6713; DOI: 10.1128/JB.00762-07.
448. Thorne C. B. *Biochemical properties of virulent and avirulent strains of Bacillus anthracis*. Ann NY Acad Sci. 1960; 88:1024–1033; DOI: 10.1111/j.1749-6632.1960.tb20094.x.

449. Thwaite J. E., Hibbs S., et al. *Proteolytic degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by Bacillus anthracis may contribute to virulence*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50(7):2316–2322; DOI: 10.1128/AAC.01488–05.
450. Timofeev V., Bahteejeva I., et al. *Insights from Bacillus anthracis strains isolated from permafrost in the tundra zone of Russia*. *PLoS One*. 2019; 14(5):e0209140; DOI: 10.1371/journal.pone.0209140.
451. Timofeev V., Bakhteeva I., et al. *New research on the Bacillus anthracis genetic diversity in Siberia*. *Pathogens*. 2023; 12(10):1257; DOI: 10.3390/pathogens12101257.
452. Tonello F., Zornetta I., et al. *Bacillus anthracis factors for phagosomal escape*. *Toxins (Basel)*. 2012; 4(7):536–553; DOI: 10.3390/toxins4070536.
453. Tournier J.-N., Rougeaux C. *Anthrax toxin detection: from in vivo studies to diagnostic applications*. *Microorganisms*. 2020; 8(8):1103; DOI: 10.3390/microorganisms8081103.
454. Tsai J.-M., Kuo H.-W., et al. *Retrospective Screening of Anthrax-like Disease Induced by Bacillus tropicus str. JMT from Chinese Soft-Shell Turtles in Taiwan*. *Pathogens*. 2023; 12(5):693; DOI: 10.3390/pathogens12050693.
455. Turell M. J., Knudson G. B. *Mechanical transmission of Bacillus anthracis by stable flies (Stomoxys calcitrans) and mosquitoes (Aedes aegypti and Aedes taeniorhynchus)*. *Infection and Immunology*. 1987; 55:1859–1861.
456. Turnbull P. C., Jørgensen K., et al. *Severe clinical conditions associated with Bacillus cereus and the apparent involvement of exotoxins*. *J Clin Pathol*. 1979; 32(3):289–293; DOI: 10.1136/jcp.32.3.289.
457. Turner W. C., Imologhome P., et al. *Soil ingestion, nutrition and the seasonality of anthrax in herbivores of Etosha National Park*. *Ecosphere*. 2013; 4(1):1–19; DOI: 10.1890/ES12–00245.1.
458. Uchida I., Hashimoto K., et al. *Virulence and immunogenicity in experimental animals of Bacillus anthracis strains harbouring or lacking 110 MDA and 60 MDA plasmids*. *J Gen Microbiol*. 1986; 132:557–559.
459. Uchida I., Sekizaki T., et al. *Association of the encapsulation of Bacillus anthracis with a 60 megadalton plasmid*. *J Gen Microbiol*. 1985; 131:363–367.
460. Uchida I., Makino S., et al. *Identification of a novel gene, dep, associated with depolymerization of the capsular polymer in Bacillus anthracis*. *Mol Microbiol*. 1993; 9(3):487–496; DOI: 10.1111/j.1365–2958.1993.tb01710.x.
461. Ullah M., Li H., et al. *Polyvinyl alcohol degradation by Bacillus cereus RA23 from oil sludge sample*. *3 Biotech*. 2019; 9(10):350; DOI: 10.1007/s13205–019–1882–6.
462. Van der Zwet W. C., Parlevliet G. A., et al. *Outbreak of Bacillus cereus infections in a Neonatal Intensive Care Unit traced to balloons used in manual ventilation*. *J Clin Microbiol*. 2000; 38(11):4131–4136; DOI: 10.1128/jcm.38.11.4131–4136.2000.
463. Van Ert M. N., Easterday W. R., et al. *Global genetic population structure of Bacillus anthracis*. *PLoS One*. 2007; 2(5):e461; DOI: 10.1371/journal.pone.0000461.
464. Walsh J. J., Pesik N., et al. *A case of naturally acquired inhalation anthrax: clinical care and analyses of anti-protective antigen immunoglobulin G and lethal factor*. *Clin Infect Dis*. 2007; 44(7):968–971; DOI: 10.1086/512372.
465. Wang D., Yu H., et al. *The complete genome sequence of Bacillus toyonensis Cbmb3 with polyvinyl chloride-degrading properties*. *J Xenobiot*. 2024; 14(1):295–307; DOI: 10.3390/jox14010018.

466. Wang X., Jiao S., et al. *Case report: Clostridial gas gangrene of pelvic wall after laparoscopic rectal cancer surgery induced fatal sepsis*. *Front Surg*. 2022; 9:822605; DOI: 10.3389/fsurg.2022.822605.
467. Wang Y., Luo J., et al. *Bacillus cereus cereolysin O induces pyroptosis in an undecapeptide-dependent manner*. *Cell Death Discov*. 2024; 10:122; DOI: 10.1038/s41420-024-01887-7.
468. Weller T. H., Coons A. H. *Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro*. *Proc Soc Exp Bio Med*. 1954; 86(4):789-794; DOI: 10.3181/00379727-86-21235.
469. *WHO AWaRe classification of antibiotics for evaluation and monitoring of use, 2023*. In: *The selection and use of essential medicines 2023: Executive summary of the report of the 24th WHO Expert Committee on the Selection and Use of Essential Medicines*, 24-28 April 2023. Geneva: World Health Organization; 2023 (WHO/MHP/HPS/EML/2023.04).
470. Wilson M. K., Vergis J. M., et al. *Bacillus cereus G9241 makes anthrax toxin and capsule like highly virulent B. anthracis Ames but behaves like attenuated toxigenic nonencapsulated B. anthracis Sterne in rabbits and mice*. *Infect Immun*. 2011; 79(8):3012-3019; DOI: 10.1128/IAI.00205-11.
471. Wood B. J., DeFranco B., et al. *Inhalational anthrax: radiologic and pathologic findings in two cases*. *AJR Am J Roentgenol*. 2003; 181(4):1071-8; DOI: 10.2214/ajr.181.4.1811071.
472. Wright A. M., Beres S. B., et al. *Rapidly progressive, fatal, inhalation Anthrax-like infection in a human: case report, pathogen genome sequencing, pathology, and coordinated response*. *Arch Pathol Lab Med*. 2011; 135(11): 1447-1459; DOI: 10.5858/2011-0362-SAIR.1.
473. Wright G. G., Green T. W., et al. *Studies on immunity in anthrax. V. Immunizing activity of alum-precipitated protective antigen*. *J Immunol*. 1954; 73(6):387-391.
474. Wright J. G., Quinn C. P., et al. *Use of anthrax vaccine in the United States: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP)*, 2009. *MMWR Recomm Rep*. 2010 Jul; 59(RR-6):1-30.
475. Wu H., Liu Q., et al. *Biodegradability of polyethylene mulch film by Bacillus paramycooides*. *Chemosphere*. 2023; 311(2):136978; DOI: 0.1016/j.chemosphere.2022.136978.
476. Wu R., Richter S., et al. *Crystal structure of Bacillus anthracis transpeptidase enzyme CapD*. *J Biol Chem*. 2009; 284(36):24406-24414; DOI: 10.1074/jbc.M109.019034.
477. Wunschel D., Fox K. F., et al. *Discrimination among the B. Cereus group, in comparison to B. subtilis, by structural carbohydrate profiles and ribosomal RNA spacer region PCR*. *Systematic and Applied Microbiology*. 1995; 17(4):625-635; DOI: 10.1016/S0723-2020(11)80085-8.
478. Xiao Z., Cheng M., et al. *Pathological changes of highly pathogenic Bacillus cereus on Pelodiscus sinensis*. *Vet Q*. 2023; 43(1):1-10; DOI: 10.1080/01652176.2023.2287191.
479. Xie T., Sun C., et al. *A new murine model for gastrointestinal Anthrax infection*. *PLoS ONE*. 2013; 8(6):e66943; DOI: 10.1371/journal.pone.0066943.
480. Xue Q., Gu C., et al. *Entry of Bacillus anthracis spores into epithelial cells is mediated by the spore surface protein BclA, integrin $\alpha 2\beta 1$ and complement component C1q*. *Cell Microbiol*. 2011; 13(4):620-634; DOI: 10.1111/j.1462-5822.2010.01558.x.
481. Yamamoto H., Uchiyama S., et al. *Cloning and sequencing of a 35.7 kb in the 70 degree-73 degree region of the Bacillus subtilis genome reveal genes for a new two-component system, three spore germination proteins, an iron uptake system and a general stress response protein*. *Gene*. 1997; 194(2):191-199; DOI: 10.1016/s0378-1119(97)00130-3.

482. Yeager L. A., Chopra A. K., et al. *Bacillus anthracis* Edema Toxin suppresses human macrophage phagocytosis and cytoskeletal remodeling via the protein kinase A and exchange protein activated by cyclic AMP pathways. *Infect Immun.* 2009; 77(6):2530–2543; DOI: 10.1128/IAI.00905–08.
483. Yousif S., Jamal M. T., et al. *Evaluation of Bacillus paramycoides strains isolated from Channa fish sp. on growth performance of Labeo rohita fingerlings challenged by fish pathogen Aeromonas hydrophila MTCC 12301.* *Microorganisms.* 2023; 11(4):842; DOI: 10.3390/microorganisms11040842.
484. Yuan X., Lyu S., et al. *Complete genome sequence of novel isolate SYJ15 of Bacillus cereus group, a highly lethal pathogen isolated from Chinese soft shell turtle (Pelodiscus sinensis).* *Arch Microbiol.* 2020; 202(1):85–92; DOI: 10.1007/s00203–019–01723-y.
485. Zainab N., Glick B. R., et al. *Deciphering the mechanistic role of Bacillus paramycoides (PM51) and Bacillus tequilensis (PM52) in bio-sorption and phyto-assimilation of Cadmium via Linum usitatissimum L. Seedlings.* *Plant Physiol Biochem.* 2024; 211:108652; DOI: 10.1016/j.plaphy.2024.108652.
486. Zasada A. A. *Injectional anthrax in human: A new face of the old disease.* *Adv Clin Exp Med.* 2018; 27(4):553–558; DOI: 10.17219/acem/68380.
487. Zhang B., Bai Z., et al. *Assessing the impact of the biological control agent Bacillus thuringiensis on the indigenous microbial community within the pepper plant phyllosphere.* *FEMS Microbiol Lett.* 2008; 284(1):102–108; DOI: 10.1111/j.1574–6968.2008.01178.x.
488. Zhang P., Zhang Y., et al. *Calibration of an upconverting phosphor-based quantitative immunochromatographic assay for detecting Yersinia pestis, Brucella spp., and Bacillus anthracis spores.* *Front Cell Infect Microbiol.* 2020; 10:147; DOI: 10.3389/fcimb.2020.00147.
489. Zhao Y., Jiang S., et al. *A virulent Bacillus cereus strain from deep-sea cold seep induces pyroptosis in a manner that involves NLRP3 inflammasome, JNK pathway, and lysosomal rupture.* *Virulence.* 2021; 12(1):1362–1376; DOI: 10.1080/21505594.2021.1926649.
490. Zhao, Y., Sun, L. *Bacillus cereus* cytotoxin K triggers gasdermin D-dependent pyroptosis. *Cell Death Discov.* 2022; 8:305; DOI: 10.1038/s41420–022–01091–5.
491. Zhu Y., Ji F., et al. *Gene clusters located on two large plasmids determine spore crystal association (SCA) in Bacillus thuringiensis subsp. finitimus strain YBT-020.* *PLoS One.* 2011; 6(11):e27164; DOI: 10.1371/journal.pone.0027164.
492. Zidon R., Garti S., et al. *Zebra migration strategies and anthrax in Etosha National Park, Namibia.* *Ecosphere.* 2017; 8(8):e01925; DOI: 10.1002/ecs2.1925.
493. Zorigt T., Furuta Y., et al. *Development of ELISA based on Bacillus anthracis capsule biosynthesis protein CapA for naturally acquired antibodies against anthrax.* *PLoS One.* 2021; 16(10):e0258317; DOI: 10.1371/journal.pone.0258317.
494. Zorigt T., Furuta Y., et al. *Pan-genome analysis reveals novel chromosomal markers for multiplex PCR-based specific detection of Bacillus anthracis.* *BMC Infect Dis.* 2024; 24:942; DOI: 10.1186/s12879–024–09817–9.
495. 孟庆珍, 尹飞, [et al.] 养殖中华鳖蜡样芽孢杆菌的分离、鉴定和致病性研究. *水生生物学报.* 2019; 43(3):570–578. DOI: 10.7541/2019.069.
496. 朱蘇煜: Romanowsky stain 的前世今生. 臺大醫院的 Liu stain(劉氏染液). *景福醫訊.* 2024; 41(12): 8–15.

497. 劉禎輝: 血液塗抹標本之一 新迅速染色法, 第一報. 臺灣醫學會雜誌, 1953; 52(6):348-352.
498. 大阪發明協會 編『帝國發明家名鑑』, 日刊工業新聞出版部, 1937, 1439 p.; DOI: 10.11501/1207646.
499. 石渡繁胤 著『蚕兒解剖法』, 群馬農報社, 1896, 20 p.; DOI: 10.11501/840641.
500. 石渡繁胤: 劇烈なる一種の軟化病(卒倒病)に就て(第一), 大日本蚕糸会報, 1901, 144, 1-5.
501. 菊池 齊: 緑膿菌と脾脱疽菌との関係, 並に緑膿菌類似菌に関する研究, 博士論文, 1928, 11-30.

Архивные документы:

1. ГАРФ. Ф. Р-9492. Оп. 10с. Д. 147. Л. 405-417.
2. ГАТО. Ф. И-7. Оп. 1. Д. 70. Л. 99-99 об.
3. ЦДНИТО. Ф.1. Оп. 5. Д. 57. Л. 146 об.
4. ГАТО. Ф. И-7. Оп. 1. Д. 79. Л. 99об, 100-100 об, 101-101 об.
5. ЦЦМСИР. Ф 479. ГИК 48575/4. С. 40

Интернет-ресурсы:

1. Виртуальная выставка ОГАУК «Томский областной краеведческий музей им. М. Б. Шатилова» «Под созвездием Большого Лосы: тайны кулайского мироздания», Режим доступа: https://tomskmuseum.ru/content/addon/virtual/Big_Elk/big-elk.html.
2. Robert Koch Institute, Режим доступа: <https://www.rki.de/>.
3. CALM, Режим доступа: <https://www2.gwu.edu/~calm/>.
4. NSW Department of Primary Industries and Regional Development, Режим доступа: <https://www.dpi.nsw.gov.au/>.
5. Anthrax in Humans and Animals. 4th edition, Режим доступа: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK310481/#_NBK310481_dtls_.
6. Amerithrax or Anthrax Investigation, Режим доступа: <https://www.fbi.gov/history/famous-cases/amerithrax-or-anthrax-investigation>.
7. Burke M. Britain's mysterious WW2 'island of death', Режим доступа: <https://www.bbc.com/culture/article/20240419-britains-mysterious-ww2-island-of-death?>
8. Buboltz J. B., Murphy-Lavoie H. M. Gas gangrene. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537030/>.

SUMMARY

The monograph *“Mysteries of Anthrax”* by Dr. Vladimir A. Gorshkov-Cantacuzene considers the *Bacillus cereus* complex and its representatives, which cause diseases common to humans and animals. The author focuses on *B. anthracis*, which not only causes a particularly dangerous infectious disease, but is also perhaps the most mysterious part of the complex. This is the second book in a series on the causative agents of particularly dangerous infectious diseases (the first is *“The Opera on the Plague”*). The book contains numerous illustrations and descriptions of clinical cases, so it is primarily intended for students of medical, veterinary and biological high schools for in-depth study, as well as for students of training programmes for specialists in safe work with pathogens of particularly dangerous infections. The simplicity of the presentation and the abundance of additional material will allow the reader to study the subject in depth, significantly exceeding the university curriculum.

The book contains drawings by Robert Koch, the German physician who discovered the causative agent of anthrax; notes and portraits of Louis Pasteur, Max Stern, Nikolai Nikolaevich Ginsburg and Alexander Lazarevich Tamarin, the Franklands and Ernst Berlin; and the author's unique methods and research findings.

Gorshkov-Cantacuzene, V. A.

The Mysteries of Anthrax : manual. – Moscow: Moscow University Press, 2026. – 462, [2] p. : il. – Electronic book for network distribution.

ISBN 978-5-19-012387-6 (e-book)

The book examines anthrax, a particularly dangerous disease common to humans and animals, whose causative agent, *B. anthracis*, is a part of the *Bacillus cereus* complex. The author offers a modern perspective on the pathogen and its closest relatives, diving into a sea of information about atypical strains to pierce the veil of secrecy surrounding this world hidden from human eyes. The book contains wide range of illustrations, including drawings by Robert Koch, which have been published in Russia for the first time, as well as unique clinical cases.

Book is primarily intended for students of medical, veterinary and biological high schools for in-depth study. It may also be of interest to interns, resident doctors, young specialists and anyone interested in the amazing and dangerous world of microorganisms.

Горшков-Кантакузен, В. А.

Г70 Мистерии сибирской язвы : учебник / В. А. Горшков-Кантакузен. – Москва : Издательство Московского университета, 2026. – 462, [2] с. : ил. – Электронное издание сетевого распространения.

ISBN 978-5-19-012387-6 (e-book)

В учебнике рассматривается сибирская язва — особо опасное заболевание, общее для человека и животных, чей возбудитель, *B. anthracis*, является членом *Bacillus cereus complex*. Автор предлагает с современных позиций посмотреть на возбудитель и его ближайших родственников, чтобы погрузившись в море информации об атипичных штаммах, немного приоткрыть завесу тайны этого скрытого от человеческого глаз мира. Книга содержит большое количество иллюстраций, включая впервые публикуемые в России рисунки Роберта Коха, а также фото уникальных клинических случаев.

Книга адресована студентам медицинских, ветеринарных и биологических вузов для углубленного изучения, а также ординаторам, врачам-стажерам, молодым специалистам и всем, интересующимся удивительно опасным миром микроорганизмов.

УДК 616.9+579.6(075.8)

ББК 55.146.26+28.487я73

Учебное издание

Горшков-Кантакузен Владимир Александрович

МИСТЕРИИ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

Учебник

Макет предоставлен автором

Электронное издание сетевого распространения

Текст печатается в авторской редакции

В настоящем издании использованы изображения: являющиеся общественным достоянием, принадлежащие автору, публикуемые на основании лицензий (в т. ч. открытых лицензий), переданные автору их владельцами, а также воссозданные (отреставрированные) с помощью алгоритмов искусственного интеллекта. На 1 странице обложки изображение гистологического среза плаценты с присутствующим в ней сибиреязвенным микробом; на 4 странице обложки — изображение хромосомы и плазмиды рX01 штамма *Bcbva* (по Klee S. R., 2010), и плазмиды рX02 штамма *B. anthracis* (по Liang X., 2016)

Макет утвержден 10.02.2026. Изд. № 13473.



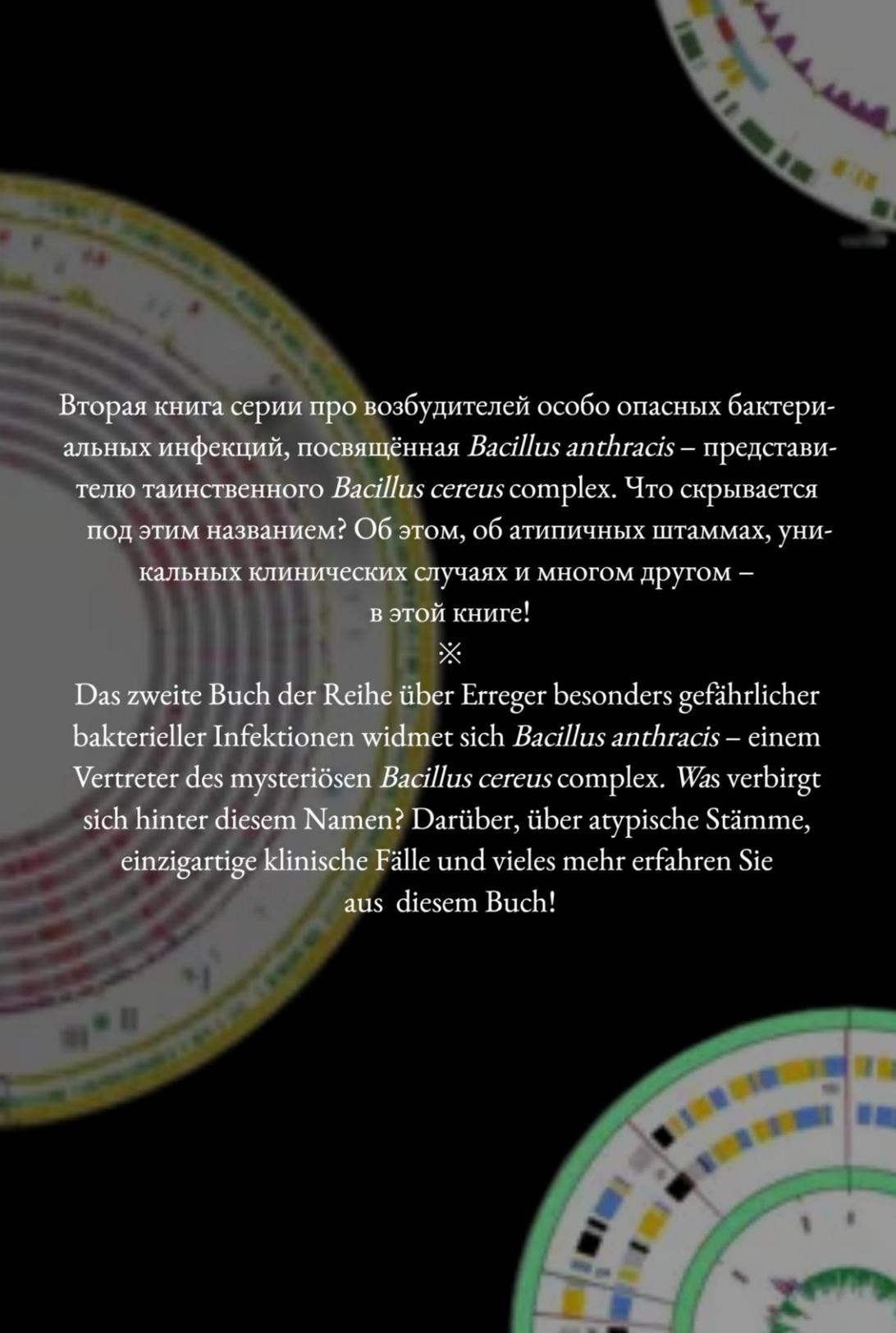
ИЗДАТЕЛЬСТВО
МОСКОВСКОГО
УНИВЕРСИТЕТА

119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 15

Тел.: (495) 939-32-91; e-mail: secretary@msupress.com

<https://msupress.com>. Отдел реализации:

тел.: (495) 939-33-23; e-mail: zakaz@msupress.com



Вторая книга серии про возбудителей особо опасных бактериальных инфекций, посвящённая *Bacillus anthracis* – представителю таинственного *Bacillus cereus* complex. Что скрывается под этим названием? Об этом, об атипичных штаммах, уникальных клинических случаях и многом другом –
в этой книге!



Das zweite Buch der Reihe über Erreger besonders gefährlicher bakterieller Infektionen widmet sich *Bacillus anthracis* – einem Vertreter des mysteriösen *Bacillus cereus* complex. Was verbirgt sich hinter diesem Namen? Darüber, über atypische Stämme, einzigartige klinische Fälle und vieles mehr erfahren Sie aus diesem Buch!