

ЛАБОРАТОРНИ ИНДИКАТОРИ КАТО ЕЛЕМЕНТИ НА ЕПИДЕМИОЛОГИЧНОТО ПРОУЧВАНЕ ПРИ АНТРАКС

Ц. Дойчинова¹, В. Дойчева², Ц. Минчева², К. Терзиева¹, Д. Георгиева¹,
И. Попиванов³ и Д. Шаламанов¹

¹Катедра „Инфекциозни болести, епидимиология, паразитология и тропическа медицина”, ФОЗ, МУ – Плевен

²Катедра „Епидемиология”, МУ – София

³Катедра „Военна медицина”, ВМА – София

LABORATORY INDICATORS AS ELEMENTS OF EPIDEMIOLOGICAL INVESTIGATION IN ANTHRAX

Ts. Doychinova¹, V. Doycheva², Ts. Mincheva², K. Terzieva¹, D. Georgieva¹,
I. Popivanov³ and D. Shalamanov¹

¹Department of Infectious Diseases, Epidemiology, Parasitology and Tropical Medicine,
Faculty of Public Health, Medical University – Pleven

²Department of Epidemiology, Medical University – Sofia

³Department of Military Medicine, Military Medical Academy – Sofia

Резюме. Разгледани са лабораторните методи за доказване на инфекция с *B. anthracis* при хората. Направена е характеристика на диагностичните тестове при трите класически форми – кожна, чревна и белодробна, както и на нововъзникналата инжекционна форма, като е обсъдено приложението на всеки метод за целите на епидемиологичното проучване. Посочена е и методичната база за откриване на този биопатоген в храни и въздух, явяващи се фактори за предаване на инфекцията. От позициите на биологичната защита в общ план е представена съвременна система за детекция и идентификация на антраксия бацил във въздуха.

Ключови думи: антраксен бацил, диагностични методи, епидемиологично проучване, биологична защита

Summary. The laboratory methods to substantiate *B. anthracis* in humans are discussed. The diagnostic tests used for laboratory confirmation in classical forms (skin, intestinal and pulmonary) as well as new injection form are characterized. The usage of each method for epidemiological investigation is discussed. The methodological base for detection of the causative agent in foods and air, which appears to be vehicles of infection, is specified. By the perspective of biological protection in general a contemporary system for detection and identification of *B. anthracis* in the air is presented.

Key words: bacillus anthracis, diagnostic methods, epidemiological investigation, biological safety

ВЪВЕДЕНИЕ

От гледна точка на приложната епидемиология лабораторните диагностични процедури за откриване на антраксна инфекция при хората могат да бъдат класифицирани като: 1. Доказващи етиологията на заболяването в клинично проявения случай – болния човек, разглеждан принципно от класическата епидемиология като източник на инфекция, и 2. Изясняващи останалите елементи на епидемичния процес и конкретно обектите/ субстанциите от средата, с които причинителят

постъпва в човешкия организъм. В първата група са предимно микробиологични тестове в класически и модерни варианти, а втората включва разнообразни изследвания с медикобиологичен, медикогеографски, екологичен и ветеринарномедицински характер, както и тестове от някои други научни области, с които епидемиологията взаимодейства.

Своеобразна специфика на изследванията дава присъствието на причинителя на инфекцията в група „А” в списъка на потенциалните агенти за биологично оръжие. Критериите за включва-

нето на антракса на това място са тежестта на предизвикваните заболявания, масовият стрес, довеждащ до психоза поради смъртна опасност и затрудненията за общественото здраве. Има натрупани множество исторически сведения от далечното и не толкова далечно минало, показващи големия интерес на военни стратегии от различни държави към този микроорганизъм. Те разкриват разработване на мащабни научни програми и провеждане на полеви изпитания, в които са проучвани ефектите от различните начини на приложение на антраксните спори, но най-вече на аерозолния. В момента има известна сигурност по отношение използването на този вид оръжие, постигната с конвенцията за контрол от 1972 г., подписана досега от правителствата на 174 държави. Сигурността обаче не е пълна, тъй като 16 страни все още не са подписали или не са ратифицирали документа. От друга страна, опасността от прилагане на биологични средства, и в частност на антраксния бацил, не е игнорирана по отношение на биотероризма – явление, зад което стоят различни групировки. Във връзка с всичко това, във военномедицинските служби и в структурите на гражданското здравеопазване е предвидена система за защита от антраксна атака. Съществен елемент на системата е обособената за целта група диагностични методи със специфична насоченост за детекция и идентификация на биопатогена.

В настоящия обзор са представени отделните методични постановки, с които се доказва наличието на антраксния бацил в човешкия организъм и присъствието му във фактори, които имат отношение към епидемичния процес. Това е направено за обосноваване подбора на необходимите лабораторни изследвания при епидемиологично проучване, провеждано в оперативен или ретроспективен порядък след настъпили естествени заразявания, а също и при ситуации, свързани с използване на антраксния бацил като биологичен агент.

ОБЩА ХАРАКТЕРИСТИКА НА МЕТОДИТЕ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА АНТРАКСНИЯ БАЦИЛ

В рутинната диагностика основно значение от класическите бактериологични методи има оцветяването по Грам и посявката върху твърди хранителни среди – кръвен агар, шоколадов агар, Мак Конки агар и триптоно-соев агар. На

такива среди микробът расте добре. Вирулентните му форми образуват характерни слюзести и грапави R-колонии с неравна периферия, оприличавани на „глава на медуза“, „лъвска грива“, „къдрава коса“, а поради сивкавобелия си цвят са сравнявани с „капки живак“, с диаметър 2-5 mm. Култивирането за вегетативни форми трае от 12 до 36 часа. Споролирането, което принципно изисква по-дълго време, се осъществява в среда без CO². На кръвен агар *B. anthracis* не създава хемолитична зона за разлика от останалите бацили. Конвенционалните методи включват също и посявки върху течни хранителни среди – например месо-пептонов бульон. Най-краткото морфологично описание на този микроорганизъм е: Gr (+), пръчковиден, спорообразуващ, неподвижен и сравнително голям – с размери на вегетативните форми дължина 4-8 μm и ширина 1-1,5 μm, с големина на спорите (които са с овална и кълбообразна форма) около 1 μm. При директна микроскопия се описват вериги от бацили, наподобяващи бамбукови пръчки (вегетативните форми), или овални струпвания (т.нар. кластъри) при спорите. При имунофлуоресцентния метод се визуализира много добре капсулата на бактерия, която има важно значение в ранните стадии на патогенезата. Методът обаче се прилага ограничено, предимно за изследователски цели. Колониите, изолирани от култури на посочените по-горе среди, задължително се подлагат на идентификация по биохимични, серологични и молекулярногенетични методи. Основното от биохимичната характеристика е, че причинителят на антракса е аероб и факултативен анаероб.

Фагодиagnostиката, базираща се на принципа лизиране на антраксни култури от специфични антраксни фаги, е имала важна роля преди появата на методите на молекулярната епидемиология. Най-много прилаган за такива цели е бил гама-фагът. У нас е патентован вариант 138 [3]. До неотдавна са използвани и няколко други диагностични теста – кожна проба с антраксин, реакция пасивна хемаглутинация, реакция непряка хемаглутинация и латекс аглутинационна проба. Последните вече не се предвиждат в диагностичния комплекс поради наличието на много почувствителни и строго специфични генетични и имунологични методики.

Биологичната проба с инокулиране на опитни животни се назначава само в изключителни

случаи, когато резултатите от други методи не са убедителни. Проследява се клиничното проявление и се прави идентифициране на изолираните от животните чисти култури. С теста реакция термопреципитация по Асколи се доказва причинителят в проби от органи на умрели хора и животни.

В съвременните условия генетичната характеристика е от особено значение предвид модерното диагностициране с методи на молекулярната епидемиология. Най-общо, генетичното разнообразие при антраксия бацил е много ниско и дори според някои автори липсва, затова се приема, че е налице антигенна и биологична еднородност на изолираните щамове в различните географски региони. Това е свързано с обстоятелството, че микроорганизмът прекарва значителна част от времето на жизнения си цикъл като спори в естествения резервоар - почвата, при което няма репликация на ДНК. Продължителните периоди на латенция са намалили силно еволюционния потенциал, защото възникването на мутации, с които видът еволюира, е функция от размножителния процес. В случая това е силно ограничено - размножаването протича само в много кратък отрязък от време, когато бактериите се намират в живи организми. Основният филогенетичен геномен маркер се оказва стабилен, а нуклеотидният полиморфизъм е изключително рядко явление, ако в някои щамове има различия в последователността на нуклеотидните бази, те са незначителни. Различията се идентифицират чрез полимеразна верижна реакция (PCR) в реално време. Доказват се две хромозомни секвенции, специфични за *B. anthracis*, както и наличието на два плаزمиди PX01 и PX02, кодиращи вирулентни фактори [10]. По методиката PCR са установени близо 100 уникални генотипа в различни части на света. За целите на приложната епидемиология генотипирането дава възможност в цялото това многообразие да бъде проследен точно произходът на щама, като изолираният в проучваната епидемична ситуация се сравнява с вариантите, заложили в световната електронна база данни.

Друго съвременно диагностично направление се базира на имунологични методи. По технологията имунохистохимично оцветяване откриването става в тъкани, фиксирани с формалин, посредством използване на антитела, специфични за клетъчната стена или за капсулата на микроба. Използват се също маркери за търсене на антрак-

сните антигени в кръвта на болния или преболедувалия; най-вече за една от съставките на антраксия екзотоксин, наречена протективен антиген (РА). Този антиген има много отговорни функции в патогенезата: 1. Посредством епитопи РА се прикрепва към съответните рецептори на човешката или животинската клетка. 2. Посредством други фрагменти от белтъчната си структура РА свързва останалите два протеинови антигени – едема фактор и летален фактор, образувайки трикомпонентен антигенен комплекс-екзотоксин. 3. РА медира транслокацията на получения антигенен комплекс, като осигурява въвеждането на токсина в цитоплазмата под форма на ендоцитозна вакуола [9]. Доказването на РА у болни става по метода ELISA чрез количествено определяне на ранните антитела от клас IgM (anti-PA IgM) или на късните антитела от клас IgG (anti-PA IgG) по колориметрична скала. Търсенето на първия вид антитела принципно е подходящо за оперативните епидемиологични проучвания, но в действителност се практикува рядко, най-вече поради кратковременното им съществуване. Търсенето на втория вид – IgG антитела РА, се използва освен за такива цели, също при ретроспективни проучвания и научноизследователски разработки, като се изяснява статусът на заболелите в протичащи в момента или вече приключили епидемични ситуации. Късните антитела се проверяват също у лица, които са имунизирани, за да се установи ефикасността на ваксината. Важно е да се проследява динамиката на титъра на антителата за определен период [17]. Доказването на антитела към останалите две субединици на екзотоксина – едема фактор (Anti-EF IgM, Anti-EF IgG), и летален фактор (Anti-LF IgM, Anti-LF IgG), е слабо застъпено.

Другите модерни диагностични реакции на имунологичен принцип са: директен имунофлуоресцентен тест (Direct fluorescent assay, DFA), имунохроматографски тест (Immunochromatography, RedLine Alert) и тестът имуноелектрофореза транс блот (Electrophoretic immunoblot, EITB) [15]. Тези методи се прилагат сравнително поограничено.

Развитието и усъвършенстването на съвременните методики за откриване и идентифициране на *B. anthracis* се осъществява бързо след извършената през 2001 г. биологичната атака в САЩ, при която с пощенски пликове бяха разпространени антраксия спори [7].

КОЖНА ФОРМА

Диагностиката и лечението на кожната форма по принцип не представлява сериозен проблем. Микробиологичната лабораторна диагностика се базира на проби, при набавянето на които трябва да се имат предвид следните моменти: В началото на заболяването – асептично вземане на везикулозна течност със стерилен тампон, преди везикулите естествено да се отворят, тъй като след отварянето им (настъпила втора фаза) в пробата може да попадне друга флора, която да компрометира резултата. В първата фаза вероятността да се направи успешно оцветяване по Грам е най-голяма. Резултатите от тестовете се оценяват комплексно и при положение че намазките се окажат отрицателни, в смисъл че не се наблюдават типичните за антраксия бактерии Gr (+) форми, изследването продължава с търсене на доказателства по другите лабораторни критерии. Автори в Бангладеш посочват, че при 2 от 15 проследени случая на кожна форма, намазките не са показали характерно оцветяване и при микроскопиране не са намерени морфологични находки, но несъответствието с първоначалната клиничната диагноза е било преодоляно с резултати от PCR. За обосноваване на диагнозата антраксна инфекция, по косвени показатели е посочен и постигнатият успешен терапевтичен отговор с ципрофлоксацин [18].

Във фазата на оформен антраксен струпей събирането на материал за изследване става, като внимателно се повдигне външният ръб на струпея и там се постави стерилен тампон; след това тампонът бавно се върти за 2-3 s под ръба на струпея, без последният да се отстранява. При оформена пустула с тампон се взема секрет от ръба на пустулата.

Трябва да се има предвид, че след 24-ия час от приема на антибиотик кожните лезии прогресивно намаляват излъчването на бактерията, докато станат стерилни (за около седмица-две). Културите от тези места могат да дадат и отрицателен резултат, дължащ се на антагонистичната дейност на микрофлората в мястото на лезията. Затова след първото или второто денонощие изолирането на антраксни бацили след култивация на материал от взети по тези начини проби е несигурно. Следователно на лабораторно доказване чрез изолиране на причинителя от лезия може

да се разчита само съвсем в началото, преди да започне редуциране на микробното число от антибиотична терапия или микробен антагонизъм.

Разгледаните по-горе особености на този вид диагностика, в смисъл непоказателен резултат поради прекратено отделяне на бацила от кожната лезия, бяха установени и при докладвания от нас случай през 2013 г. [1]. Непосредствено след хоспитализирането на Г.Б.П., 32-годишен, се направиха изследвания с оцветяване по Грам и директната микроскопия на смив от раната, които се оказаха отрицателни. Културалното изследване върху кръвен агар също не даде растеж. Обясняваме го с данните от анамнезата, според които болният е имал еднократен прием на доксициклин, преди да постъпи в болницата. Диагнозата беше верифицирана с анализа на няколко други проби: 1. Ексудат от рана по методиката real time PCR (чиято свръхвисока чувствителност позволява откриване на отделни фрагменти от генетичния материал) изследван в НЦЗПБ – с положителен резултат, и 2. Проби от ухо и кожа от овцата, изследвани в Националния диагностичен научноизследователски ветеринарномедицински институт (НДНИВМИ) – за изолиране на бацили или спори и за установяване преципитация на антраксен антиген, които също бяха положителни. Освен етиологично по посочените лабораторни методики заболяването антракс се потвърди и с данни за епидемиологична връзка на хоспитализирания пациент с болно животно – клане и разфасоване в рамките на типичния инкубационен период. По този начин се покриха всички критерии на Наредба 21 на МЗ от 2005 г. за регистрация на заболяването и случаят бе класифициран и обявен като протичащ с типична клинична картина, който е лабораторно потвърден.

ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЕН АНТРАКС

Статистиката категорично показва, че тази форма е характерна най-вече за развиващите се страни и в малка степен за развитите [13, 14]. Вероятно не всички възникнали случаи в първата група държави се отчитат поради непълна диагностика или по редица други причини, т.е. истинската честота по света не е добре известна. Обикновено лабораторни изследвания с насоченост за гастроинтестинален антракс се назначават при пациенти с орална, стомашна или чревна симпто-

матика в съчетание с данни (анамнестични или от друг източник) за скорошно консумиране на месо от болно домашно животно. Когато последната информация липсва (или е спестена), доказването често става след развита хирургична симптоматика, по правило драматична, или пост мортем. В подкрепа на това има немалко примери, като описания по-долу от проучването на Канафани и кол. Авторите правят разбор на ситуацията в долината Бекаа в Ливан през 1960 г. с регистрирани повече от 100 случая. Причината за бързо развита се в региона чревна епидемия се изяснява едва след смъртта на 30-годишна жена, постъпила с коремни симптоми, асцит, илеус, с направена по спешност лапаротомия и чревна резекция. От силно увеличените мезентериални лимфни възли е взета биопсия. Патоанатомично е установено централна некроза с кръвоизлив и обширен оток, а микробиологично – верижки от Gr (+) бацили. Посевките на култури от кръв и тъкан от лимфните възли са показали *B. anthracis*. Биологична проба с материал от лабораторните посеви върху опитни животни е довела до смърт за около 20 часа; освен това в слезките са открити големи количества антраксни бацили. Идентичността на бацила е потвърдена с микробиологичен анализ на тъканите от биопсията в Центъра за контрол и превенция на заболяванията (CDC) в САЩ. Тези резултати насочват изследователите да търсят нови данни, при което съпругът на починалата е признал, че 4 дни, преди да заболее жена му, е заклал умираща коза. В кожата на животното е доказан антраксен бацил. Месото е било консумирано след недостатъчна термична обработка (а дори и сурово) освен от семейството на починалата жена, също и от жители на населеното място и от няколко отдалечени села. Сред консумиралите в това епидемично огнище е имало и лица, при които заболяването се е проявило само с неясна коремна болка и лека диария. Микробиологичните изследвания на изпражненията при тях не са показали растеж [16], подобно на други описани леки случаи [2]. Други клинични материали, подходящи за микробиологични изследвания при гастроинтестинален антракс, са фекалии и перитонеална течност при хирургически операции, лезии от гърлото при орофарингеална форма.

Диагностичният комплекс при гастроинтестиналния антракс включва освен традиционните микробиологични методи култивиране, микро-

скопия и биохимични отнасяния, още и потвърдително изследване на изолатите с полимеразна верижна реакция. Със скенираща компютърна томография (с венозна контрастна материя) се открива увеличението на лимфните възли в корема [15].

Рутинните методи за доказване на антраксния бацил в месо и месни хранителни продукти са класическите бактериологични изследвания – посеви, микроскопиране, топла и студена асколи реакция. PCR също може да се използва за откриване и идентифициране на антраксния бацил в храни. Описани са възможностите на технологията *real time PCR* – вариант пиросеквениране като бърз (времетраене 7,5 часа), специфичен (94-100% идентичност) и високочувствителен метод за доказване на биопатогена в мляко, вода, сок и преработена храна [5].

ИНХАЛАТОРЕН АНТРАКС

Микробиологичните показатели са от особена важност за потвърждаване на диагнозата инхалаторен антракс, както е и при останалите три форми, но тези показатели не са налични в началото. Поради необходимото минимално технологично време от поне две денонощия, при свръхбързо протичане на заболяването с настъпила бактериемия, резултатите от посеви на храчки, назален секрет и кръв могат да се получат след като пациентът е починал, или при по-леките форми, с навреме започнато и адекватно проведено лечение – когато пациентът е оздравял. Много характерен е рентгенографският образ на гръдния кош и конкретно на медиастиnum: силно разширен поради увеличени лимфни възли и оток. Това е основният параклиничен критерий в началния период. Нерядко се наблюдава и плеврален излив, течността от който, взета посредством пункция, е с кръвенист цвят. Компютърната томография на гръдния кош е по-показателен рентгенологичен метод и се предпочита пред обикновената рентгенография. Култивиране, посеви и последващи намазки за оцветяване по Грам, микроскопиране и биохимичен анализ се правят от изолати от посочените клинични материали – храчки, назален секрет, кръв и плеврална течност. При напреднал процес се откриват повишени трансaminaзи, хипоксемия, метаболитна ацидоза и леко изразена левкоцитоза с повишен процент на неутрофили-

те. При починали пациенти хистопатологичните анализи показват периваскуларна и перибронхиална хеморагия, некроза и изобилие на Gr (+) бацили [15].

Динамиката на антителата при инхалаторен антракс сред пощенските служители, заразени се при сортиране и обработка на контаминирани писма през 2001 г. в САЩ, е проследена от Конрад и кол. Проучващите ситуацията засичат появата на късните anti-PA IgG по метода ELISA 11 дни след началото на симптомите (или 15 дни след експозицията) и установяват нарастване на титъра за 4-8 седмици. Пиковите стойности са достигнати между 38-ия и 65-тия ден от началото на заболяването и са варирали в интервала от 168,5 до 1449,5 $\mu\text{m/l}$. Антителата са останали откриваеми в ниски концентрации (между 12.6-107.8 $\mu\text{m/l}$) в шестимата останали живи пациенти 8-16 месеца (т.е. от 240-480 дни) след появата на симптомите [6]. При сравняване на антитялообразуването при болните с белодробна форма с това на болните от кожна форма от същото епидемично огнище авторите установяват, че откриването на anti-PA IgG при втората група случаи става най-рано 12 дни след началото на симптомите (съответно 24 дни след експозицията), а последното време, при което пациент с кожен антракс е имал доказуемо ниво на анти-PA IgG, е било на 34-тия ден след появата на симптомите, или на 41-вия ден след датата на осъществена експозиция с антраксен прах от пощенски плик.

В проучване на ранния имунен отговор при кожна форма на антракса, извършено от Догани и кол., в което двукратно са определяни трите варианта на IgM при 17 пациенти, са установени следните стойности на анти-PA IgM: недоловими в първите дни на заболяването, до максимум 7,1 $\mu\text{m/l}$ (само в един случай) на 12-ия ден [8]. Другият клас антитела - IgG, даващи представа за вторичен имунологичен отговор, са по-изразени. N. Ghosh и кол. установяват при 116 болни от кожен антракс нива на anti-PA IgG от 5,3 $\mu\text{m/l}$ до 166,3 $\mu\text{m/l}$ [11]. Данните дават основание да се предположи, че антитялоотговора при кожния антракс е определено по-краткотраен и по-слабо проявен в сравнение с инхалаторния.

За биологичната защита е особено важно установяването на антраксен бацил във въздуха. През последното десетилетие бяха разработени няколко системи за мониториране на въздуха в

полеви и стационарни условия по отношение на биопатогени, в т.ч. и на антракс. Една от тях е системата Autonomous Pathogen Detection System (APDS), осигуряваща напълно автоматизирана детекция и идентификация. Предназначена е за проследяване микробната контаминация на въздуха в рискови обекти от инфраструктурата – гари, летища, пристанища. Фазата детекция, т.е. установяване само наличието на частици от белтъчно естество във въздуха, се извършва посредством методиката флоуцитометрия. Суспектните проби преминават през втора фаза, като се подлагат на двойна потвърдителна идентификация за намаляване процента на фалшивоположителни резултати. Първо се изпълнява имуноензимен тест на база антиген-антитяло реакция за около 30 мин. Положителните проби минават второ тестване по Rapid-PCR за още 30 мин. Настоящата модификация на системата има възможност да тества въздуха едновременно за 10 биологични агента, като се разработват нови версии с многократно по-големи възможности [4].

ИНЖЕКЦИОНЕН АНТРАКС.

АНТРАКСЕН СЕПСИС, АНТРАКСЕН МЕНИНГИТ

Инжекционната форма е открита и обособена като самостоятелна след 2000 г. [12]. Различава се от класическите форми по начина на внедряване на биопатогена – постъпва по изкуствен начин, след венозно инжектиране; по инкубационния период, който е много кратък – обикновено 1-3 дни, и по-агресивното протичане. Попадайки в кръвообращението, причинителят предизвиква първично развитие на сепсис. Досегашните наблюдения са показали почти винаги летален изход. Лабораторната диагноза на този вид антраксена инфекция се основава на доказване на патогена, обикновено чрез култура и/или чрез полимеразна верижна реакция, в материал, взет директно от раната на пациента на входната врата (мястото на инжекцията, в което обикновено има показателни признаци на възпаление). Диагнозата се потвърждава допълнително чрез откриване на специфични антитела в един по-късен етап.

Антраксният сепсис се развива също и след прогресия на трите класически форми. Най-често това става при белодробната форма и много по-рядко при кожната. Основен микробиологичен индикатор за първичен и за вторичен сепсис е кръв-

ната култура. Хемокултурата е показателна преди назначаване на антибактериална терапия, когато резултатът е положителен в 100 %. При директна микроскопия на намазка от хемокултура се виждат масово бактерии с разгледаните в началото на статията морфологични характеристики.

Антраксният менингит се разглежда като друго възможно усложнение на болестта. При пациенти с менингеални симптоми, развити след прогресия на някоя от класическите форми, основно на белодробната, е показана лумбална пункция. Находката е кръвениста на цвят цереброспинална течност, с полиморфонуклеарни неутрофили и множество G⁺ бацили при микроскопиране.

ОБОБЩЕНИЕ

Висцералните форми на антраксна инфекция, в преобладаващата си част протичащи тежко, показват някои общи характеристики на симптоматиката и затова понякога в началните стадии трудно се разграничават. Това извежда на преден план решаващото значение на параклиничната диагностика за терапията и профилактиката. За навременно лечение и за целите на биологичната защита е важна бързината и специфичността на диагностичните тестове. В тази насока протича усъвършенстване и модернизация. Полимеразната верижна реакция в реално време е такъв пример и отговаряйки позитивно на тези условия, днес тя е основният утвърден рутинен метод за всички клинични форми.

Микробиологичната диагностика включва процедури, при които се работи с материали, съдържащи антраксни бацили във високи концентрации. Такива са клинични проби от пациенти; също хранителни среди, в които биопатогенът е намножен. Това изисква специални условия на работа, в които епидемиологичните рискове са минимизирани. Международен стандарт в това отношение е лаборатория от ниво BSL-2 (Biological Safety Level-2). В нашата страна Лабораторията за особено опасни бактериални инфекции към НЦЗПБ е сертифицирана по тези изисквания. По отношение на лечението, специализирана болнична структура, отговаряща на съвременните международни стандарти за биологична безопасност, е Инфекциозна клиника на ВМА. Серологично диагностициране по тези правила и по модерните методики у нас е възможно само в няколко

научноизследователски лаборатории (в НЦЗПБ, НДНИВМИ и ВМА). Лабораторните съоръжения, които са проектирани и оборудвани по възприетите стандарти за биологична сигурност, защитават персонала, работещ в тези структури, и предотвратяват изнасяне на биопатогени в околната среда, като по този начин гарантират сигурност за обществото.

За постигане целите на епидемиологичното проучване при поява на антраксна инфекция или на по-дългосрочен епидемиологичен анализ следва да се направи подходящ подбор на методи и да се осъществи колаборация с експертите в посочените специализирани лабораторни структури.

Библиография

1. Дойчинова, Ц., Ганчева Г., Шаламанов Д., Ненова Р., Иванова С., Петков Й. Случай кожной формы антракса. Медицинский вестник Юга России, 2013, 2, 124-127.
2. Кебеджиев, Г. Клиника на антракса. – В: Антракът в България. С, БАН, 1989, 122-130.
3. Късовски, В. Изолиране, проучване, произвеждане на антраксни бактериофаги и разработване на приложението им в диагностиката. Канд. дис., С. ВВМИ, 1969.
4. Попиванов, И. и А. Петков. Биологична защита. – В: Превантивна военна медицина. С., ВМА, 2010, 225-226.
5. Amoako, K. K. et al. Rapid detection and identification of *Bacillus anthracis* in food using pyrosequencing technology. – *Int. J. Food Microbiol.*, 165, 2013, № 3, 319-325.
6. Conrad, P. Q. et al. Immune Responses to *Bacillus anthracis* Protective Antigen in Patients with Bioterrorism-Related Cutaneous or Inhalation Anthrax. – *J. Infect. Dis.*, 190, 2004, № 7, 1228-1236.
7. Dewan, P. et al. Inhalational Anthrax Outbreak among Postal Workers, Washington, D.C., 2001. – *Emerg. Inf. Dis.*, 8, 2002, № 10, 1066-1072.
8. Doganay, M. et al. The early humoral immune response to *Bacillus anthracis* toxins in patients infected with cutaneous anthrax. – *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 62, 2011, № 2, 164-172.
9. Fabien Brossier et al. Functional Analysis of *Bacillus anthracis* Protective Antigen by Neutralizing Monoclonal Antibodies. – *Infect. Immun.*, 72, 2004, № 11, 6313-6317.
10. Fasanella, A. *Bacillus anthracis*, virulence factors, PCR and interpretation of results. – *Virulence*, 4, 2013, № 8, 659-660.
11. Ghosh, N. et al. Development & validation of a quantitative anti-protective antigen IgG enzyme linked immunosorbent assay for serodiagnosis of cutaneous anthrax. – *Indian J. Med. Res.*, 142, 2015, 196-204.

12. Grunow, R. et al. Injection Anthrax – a New Outbreak in Heroin Users. – Dtsch. Arztebl. Int., **109**, 2012, № 49, 843-848.
 13. Hashemi, S. et al. A Case of Fatal Gastrointestinal Anthrax in North Eastern Iran. – Case Reports in Infectious Diseases, 2015 ID 875829, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/875829>
 14. Heyworth, B. et al. Anthrax in the Gambia: an epidemiological study. – Br. Med. J., **4**, 1975, (5988), 79-82.
 15. Hicks, C. W. et al. An overview of anthrax infection including the recently identified form of disease in injection drug users. – Intensive Care Med., **38**, 2012, № 7, 1092-1104.
 16. Kanafani, Z. et al. Endemic Gastrointestinal Anthrax in 1960s Lebanon: Clinical Manifestations and Surgical Findings. – Emerg. Infect. Dis., **9**, 2003, № 5, 520-525.
 17. Quinn, C. P. et al. Specific, sensitive, and quantitative enzyme-linked immunosorbent assay for human immunoglobulin G antibodies to anthrax toxin protective antigen. – Emerg. Infect. Dis., **8**, 2002, 1103-1110.
 18. Siddiqui, M. A. et al. Recent outbreak of cutaneous anthrax in Bangladesh: clinico-demographic profile and treatment outcome of cases attended at Rajshahi Medical College Hospital. – BMC Research Notes, 2012, 5, 464.
- ✉ *Адрес за кореспонденция:*
Доц. д-р Д. Шаламанов, дм
Катедра „Инфекциозни болести, епидемиология, паразитология и тропическа медицина“
Факултет „Обществено здраве“
Медицински университет
ул. „Св. Климент Охридски“ № 1
5800 Плевен
☎ 064 884 225
e-mail dshalamanov@abv.bg

ОФЕРТИ ЗА РЕКЛАМНО УЧАСТИЕ В ИЗДАНИЯТА НА ЦМБ:

1. Отпечатване на многоцветна рекламна страница:

- на корица – 720 лв.;
- в книжното тяло – 600 лв.

2. Отпечатване на черно-бяла реклама и/или текст за 1 страница – 150 лв.

3. Разпространение на готова вложка със списание – 1.20 лв./брой.

При отпечатване на повече от една реклама се правят отстъпки по договаряне.

По желание на рекламодателя многоцветните реклами могат да бъдат придружени от безплатно отпечатване на 1 страница текст след съгласуване на съдържанието му с редколегията.

Всеки рекламодател получава книжки от списанието.