

ТУЛЯРЕМИЯ

**(микробиология
и лабораторная диагностика)**

Борздова Ирина Юрьевна, канд. мед. наук
2020

Туляремия - (синонимы болезни: малая чума, болезнь Франсиса, кроличья лихорадка, мышьяная болезнь, лихорадка от оленьих мух)-острая природно-очаговая инфекционная болезнь из группы бактериальных зоонозов, которая вызывается туляремийной бактерией, передается контактным, воздушно-пылевым, алиментарным и трансмиссивным путем , характеризуется лихорадкой, специфическим лимфаденитом и поражением в зависимости от входных ворот кожи, глаз, миндалин, легких и других органов.



Относится к природно-очаговым зоонозам, распространенным преимущественно в ландшафтах умеренного климатического пояса Северного полушария .

Возбудитель туляремии - **Francisella tularensis** - был открыт в свое время двумя американскими исследователями, Г. Мак-Коем и Ш. Чепином, во время эпизоотии (эпидемия среди животных), повально косившей земляных белок в районе озера Туляре в Калифорнии. По названию озера и была именована впервые описанная болезнь. Более подробно возбудителя изучал Э. Френсис, в честь которого и назван род.



На территории РФ циркулирует и выделяется - ***F. tularensis holarctica***.

Классификация:

Надцарство: Procarvota

Царство: Bacteria

Тип: Proteobacteria

Класс: Gamma proteobacteria

Отряд: Thiotrichales

Семейство: Francisellaceae

Род: Francisella

Вид: *Francisella tularensis*

А вид *Francisella philomiragia*- условно патогенный

Francisella tularensis

<i>Nearctica</i> Тип А	<i>Holarctica</i> тип В		<i>Mediasiatica</i>	<i>Novicida</i>
	<i>Japonica</i>	biovar I <i>eryS</i>		

Устойчивость к физическим и химическим факторам:

- в зерне и соломе при $t=0$ °C до 6 мес,
- в замерших трупах животных - до 8 мес.
- кипячение убивает , а 60 °C - убивает в течении 20 мин.
- действие солнечных лучей - погибают за 30 мин.
- рассеянный свет -до 3 дней.
- в замороженной воде -до 10мес.
- во влажной почве при 4 °C - >4 месяцев.
- в молоке, сливках при 15 °C -до 8 сут; в замороженных - 3 мес.
- Микроб не стоек к лизолу, фенолу, хлору, сулеме.
- Особенно чувствительны к этиловому спирту- менее 1мин.

чувствителен к:

- аминогликозидам,
- стрептомицину,
- гентамицину,
- канамицину,
- тетрациклинам,
- хлорамфениколу
- хинонам,

резистентен к:

- пенициллинам,
- цефалоспорином
- полимиксину.



Морфология:

Возбудитель туляремии грамотрицателен .

Форма: кокковидная или палочковидная

0,3—0,7 мкм-длина и 0,2-0,4 мкм-ширина.

Микроб неподвижен,

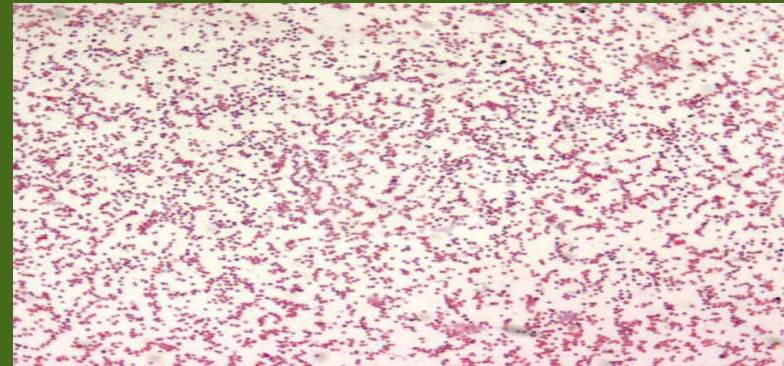
-спор не образует,

-имеет небольшую капсулу.

Морфология клеток типична в

логарифмической фазе роста на жидких средах,

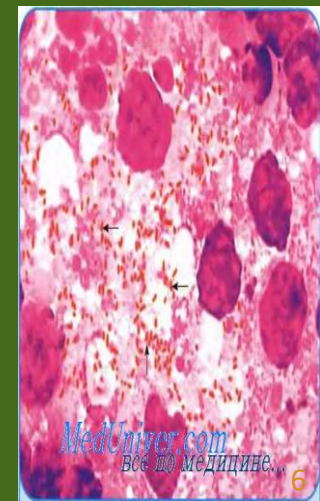
в стационарной фазе роста клетки часто вытянуты.



При культивировании на:

- искусственных пит. средах-мелкие кокки.

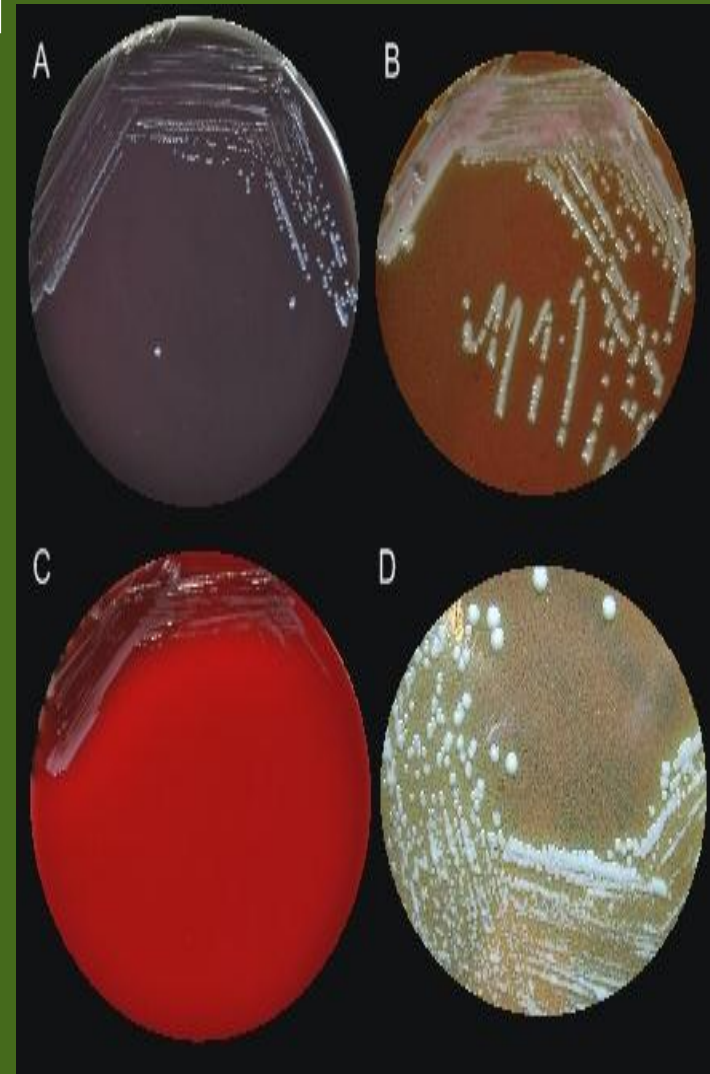
- в органах животных -палочковидные.



Франциселлы — факультативные анаэробы; оптимальная t роста 37°C .

Посев применяют для выделения культуры из **органов павших или забитых диких и лабораторных животных**, а также зверьков с патологоанатомическими изменениями.

Клещей, воду, почву, смывы с объектов внешней среды не исследуют ввиду их низкой концентрации и загрязнения посторонней микрофлорой.



Биохимические свойства возбудителя туляремии:

Ферментирует с образованием кислоты без газа:

- глюкозу, мальтозу,
- левулезу и маннозу;

Не сбраживает

- лактозу, маннит
- рамнозу,сахарозу

Образует сероводород и редуцирует тионин, метиленовый голубой, малахитовый зеленый.

Индол не образует.

- **Подвид *tularensis*.** Ферментирует глицерин, содержит цитруллинуреидазу.
- **Подвид *holarctica*.** Не ферментирует глицерин, не содержит цитруллинуреидазу. *Japonica* ферментирует.
- **Подвид *mediasiatica*.** Бактерии ферментируют глицерин. Содержит цитруллинуреидазу.
- **Подвид *novicida*** Содержит цитруллинуреидазу, глицерин ферментирует –вариабельно.

Возбудитель туляремии - внутриклеточный паразит.

Его **патогенность** обусловлена :

- капсулой, угнетающей фагоцитоз;
- нейраминидазой, способствующей адгезии;
- эндотоксином (интоксикация);
- аллергенными свойствами клеточной стенки
- способностью размножаться в фагоцитах и подавлять их киллерный эффект;
- наличием рецепторов, подавляющих активность систем комплемента и макрофагов.

Вирулентность туляреми́йного микроба зависит от его подвида.

1. Подвид *nearctica* (тип А):

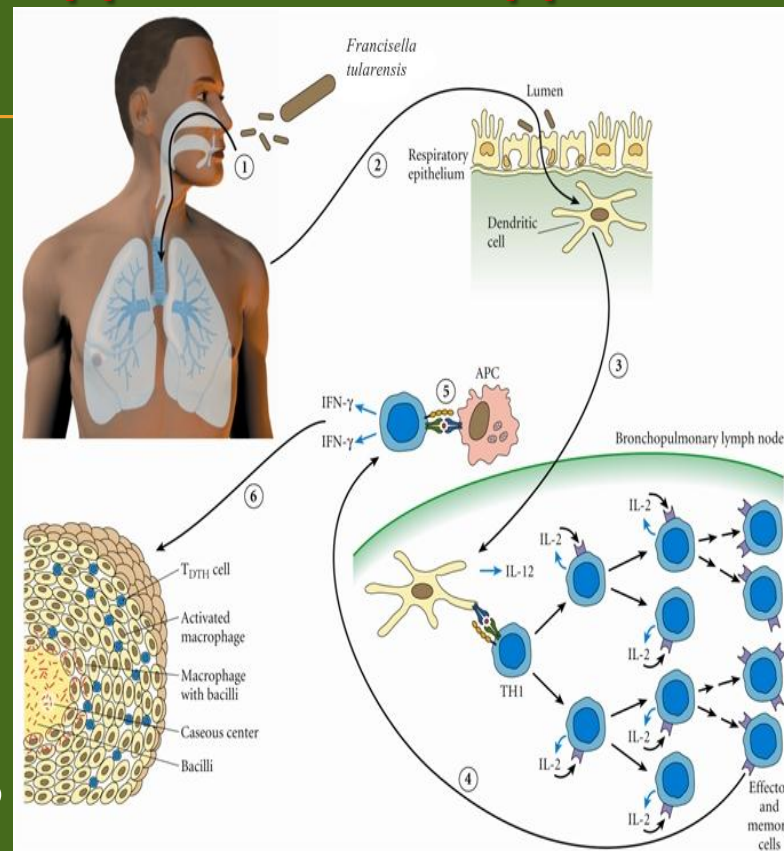
LD_{50} для кроликов $< 10^1$ м.к. обладает наибольшей вирулентностью для человека и кроликов.

2. Подвиды *holarctica* (тип В) 3. *mediasiatica* :
 LD_{50} для кроликов $> 10^6$ м.к. характеризуется меньшей вирулентностью.

4. Подвид *novicida*: $LD_{50} > 10^6$ м.к. обладает сниженной вирулентностью для кроликов, а для человека недостаточно известна.

В патогенезе туляремии выделяют стадии:

1. Внедрения и первичной адаптации.
2. Лимфогенного заноса.
3. Первичных регионарно - очаговых (туляремийный бубон) и общих реакций.
4. Гематогенных метастазов и генерализации.
5. Вторичной полиочаговости.
6. Реактивно - аллергических изменений.
7. Обратного метаморфоза и выздоровления.



Антигенная структура.

Vi – комплекс, оболочечный тип «поверхностно-соматический» содержит липиды и белки;

O-комплекс, расположен в клеточной стенке и капсулоподобном слое бактерии, термостабильный гликопротеид.

С утратой **Vi – веществ** бактерии становятся авирулентными и неиммуногенными. После обработки мик. клеток s- штамма Vi- сывороткой у них выявлялся капсулоподобный покров.



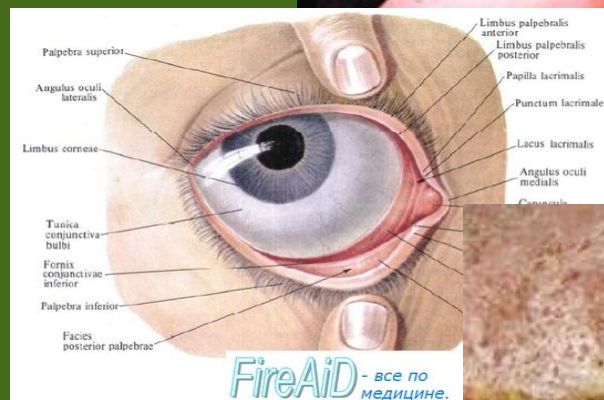
Объекты подлежащие исследованию на туляремию.

от больных людей:

- содержимое бубона,
- материал из зева,
- КОНЪЮНКТИВЫ глаза,
- отделяемое язвы,
- мокрота,
- кровь и сыворотка крови,
- испражнения.

от умерших людей:

- увеличенные л/у,
- измененные участки легких и селезенки.



При эпизоотологическом обследовании исследуют:

- диких млекопитающих или их трупы,
- гнезда грызунов,
- продукты жизнедеятельности млекопитающих,
- погадки птиц, помет хищных млекопитающих,
- солому, талую воду и др.,
- воду из водоемов и колодцев,
- гидробионтов, членистоногих,
- эктопаразитов.
- кровососущих двукрылых.



СБОР И ДОСТАВКА МАТЕРИАЛА В ЛАБОРАТОРИЮ.

В первую очередь исследуют зверьков, найденных мертвыми (счесывают эктопаразитов).



Взвешивают с точностью до 0,5 г, измеряют длину тела, хвоста, высоту уха, определяют пол, возраст и генеративное состояние. Возможна обработка зверьков на месте сбора, вскрытие и помещение органов в консервант для доставки в лабораторию.

Трупы зверьков:

- погибших в природе,
- павших в лаборатории,
- с патолог. – анатом. изм.



исследуют
индивидуально

**методы: биологический,
бактериологический,
молекулярно-генетические,
серологические.**

У животных с признаками разложения исследуют костный мозг трубчатой кости.

У **сильно разложившихся трупов** применяют н/к метод заражения биопроб. животного.

Мумифицированные трупы – исследуют ПЦР, РНАт, РИФ позволяющими обнаружить тул. Аг.¹⁶

Мелкие млекопитающие, добытые орудиями лова или живыми-биологическая проба. Применяют групповое исследование (5 - 10) одного вида и пойманных в одном месте.

Органы жив., у которых на вскрытии обнаружены пат.-анат. изм., исследуют индивидуально (посев и бактериоскопия).

Животных, добытых живыми, исследуют на наличие Ат, используя сыворотку крови (консервируют мертиолом натрия (1:10000)) или "смывы" из грудной полости. Можно использовать плазму крови (из сердца или периферических сосудов), сходное разведение приравнивается 1:5.



Мелкие млекопитающие, добытые орудиями лова или павшие, в грудной полости после взятия материала для бактер. иссл. готовят суспензию из сгустков крови сердца ("смыв" 1:10.).

"Смывы", исследуют в РНГА и ПЦР.

Возможно производить забор сыворотки и цельной крови на фильт. бумагу, предварительно обработанную мертиололатом натрия (1:1000).



Все млекопитающие по отношению к туляремии делятся на три группы:

1) высоковосприимчивые и высокочувствительные млекопитающие. В основном грызуны, зайцеобразные и насекомоядные;

2) высоковосприимчивые, но малочувствительные млекопитающие - полевая мышь, все виды крыс и сусликов, белки, бурундуки, ежи, бобры и некоторые другие виды млекопитающих;

3) маловосприимчивые и практически нечувствительные млекопитающие. Большинство хищных и сельскохозяйственных животных.

Домашние животные

(3-я группа).

Серологические методы
(РА - 1:40 и РНГА, 1:160),
реже – внутрикожную пробу
с тулярином.

Посевы или биол. пробу применяют при
исследовании павших, забитых, больных жив-х
(л/у, селезенка).



Клещей (50 особей), промывают в 10 мл спирта, 3 раза в Д.В, растирают в ступке с 5 мл 0,9% NaCl.



Личинок, блох, вшей (100 - 200 экз), нимф (50 - 100), растирают, добавляют 1 - 3 мл 0,9% NaCl.



Кровососущих двукрылых усыпляют парами эфира. У слепней отстригают ноги и крылья. В 1 анализ **слепней (25 - 50)** или **комаров (100)**, или **мошек (250)**, растирают в ступке, добавляют 5 мл 0,9% NaCl.



Гидробионтов - промывают в воде и Д.В., объединяют в группы по 5 - 10 - 50 экз., растирают, добавляют 2 - 5 мл 0,9%NaCl.



Исследование объектов внешней среды .

Пробы- 100 - 200 мл воды берутся в затененном месте, на глубине 10 - 20 см от поверхности стоячей (слабо проточной) воды в стер. бутылочки (200 - 250 мл).



В зимнее время пробы берут в прорубях, при глубоком промерзании со дна берут лед или ил.



С гнездового материала делают смыв 0,9%- NaCl. -5 - 10 г субстрата помещают в стер. сосуд, заливают двойным по весу количеством р-ра и встряхивают.

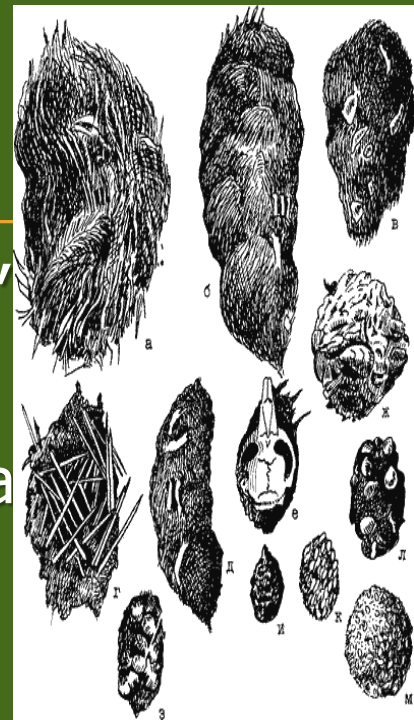


Подготовка: погадки птиц и помет хищных млекопитающих к исследованию. Материал просушивают и взвешивают до 0,1 г.

Первый способ - образец помещают в пакетик, верхний край перегибают и сшивают. Шприцем через прокол верхнего края вводят подогретый (до 70 °С) 0,9% раствор NaCl. Содержимое пакета разминают и через 20 - 30 мин. отжимают в пробирку, отрезав нижний край.

Суспензию обеззараживают, адсорбируют взвесью 50%-ных формализированных эритроцитов. Через 20 - 30 мин. центрифугируют 10 - 15 мин (2000 об./мин.).

Второй способ- образец растирают пестиком в фар. ступке с подогретым до 70 °С 0,9% NaCl. Полученную взвесь отсасывают через кусок стер. ваты пипеткой, переносят в пробирку и обеззараживают. Суспензию фильтруют до получения прозрачной жидкости.



Методы лабораторной диагностики

Бактериоскопия.

Ввиду очень мелких размеров тул. микроб может быть обнаружен в мазках – отпечатках из обильно обсемененного пат. мат.

Метод не используется при исследовании воды, смывов с объектов внешней среды.

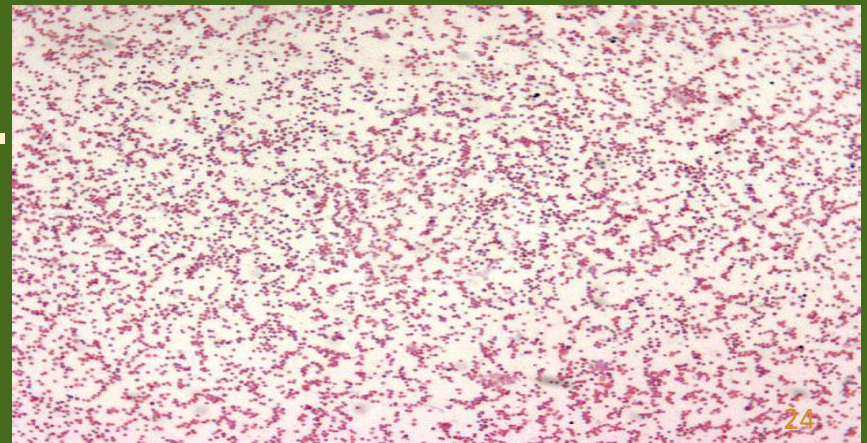
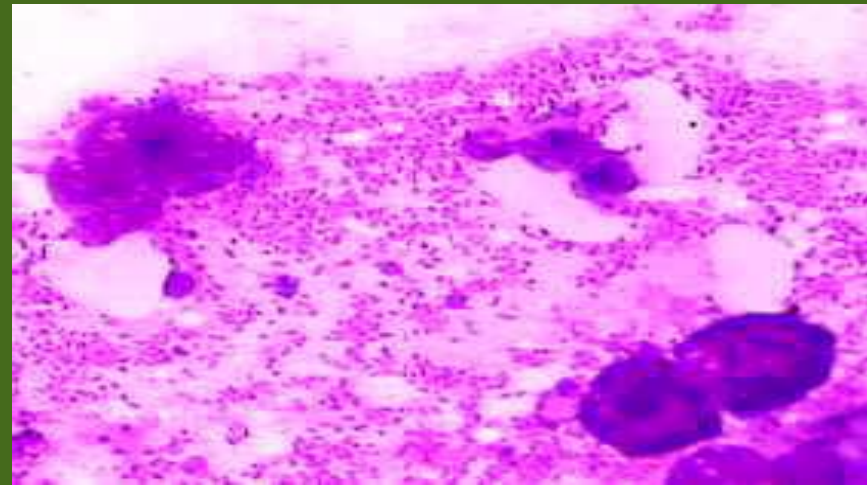
Романовский- Гимзе

окрашиваются в темно-фиолетовый цвет и четко дифференцируются от светло-сиреневого окружающего фона.

биполярно не окрашиваются.

кучечное расположение.

Грам-окрашиваются в слабо-розовый цвет.



Люминесцентная микроскопия(РИФ) выявляет живые и мертвые бактерии при концентрации 1 млн. м.к. в 1 мл.

Для РИФ (МФА) используют сухую люм. тул. сыворотку:

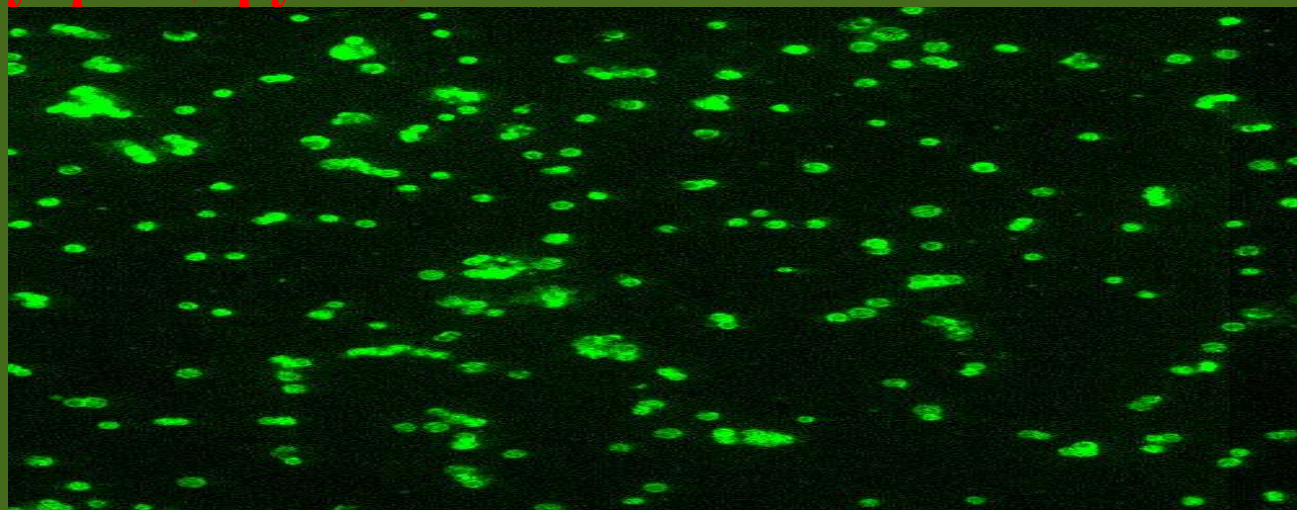
-«Медгамал» НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, г. Москва

-ФКУЗ Ставропольский противочумный институт .

**Непрямой метод флуоресцирующих Ат
(НРИФ)**

Аг(ис) + Ат+Ат

Аг+Ат(ис)+Ат



В положительном случае будут видны ярко светящиеся на 3-4 креста мелкие коккобактерии с темным центром (ярко изумрудно-зеленое свечение особенно по периферии клетки).

Свернутая желточная среда Мак-Коя. При обильном засеве рост через 24-48 ч в виде сплошного газона с шероховатой поверхностью.

Кровяная среда Емельяновой. Колонии имеют беловато-голубоватый оттенок, круглые, блестящие, с ровными краями,

Среда Ухалевой-Михалевой. Формирующиеся колонии беловатые, блестящие, гладкие, с ровными краями.

Среда Френсиса: культура имеет вид небольших (1—2 мм), круглых, выпуклых, гладких, блестящих, с ровными краями колоний беловатого цвета с голубоватым оттенком; рост отмечается через 2—3 сут.

Среда туляремийная (Т): Среда обеспечивает рост единичных бактерий, голубовато-беловатые прозрачные гладкие блестящие колонии

Бульон туляремииный (Т): рост в виде пленки на поверхности бульона.

Среды АДТ и СКТ: рост единичных тул. микробов в течение 48 ч.

FT агар- среда для культивирования и выделения туляремийного микроба

АДЭТ-среда элективная для выделения возбудителя туляремии сухая

Среда Анциферова

Модифицированный вариант агара LB



Биологический метод.

Используют высокочувствит. лаб. жив-х – б/м, м/с.
Заражение **1 м.к.** возбудителя, приводит к развитию
инфекционного процесса и накоплению микробов.

Животных заражают п/к с
внутренней стороны задней
правой ноги :

б/м - 0,5 мл,
м/с - 1-2 мл.

выдерживают:

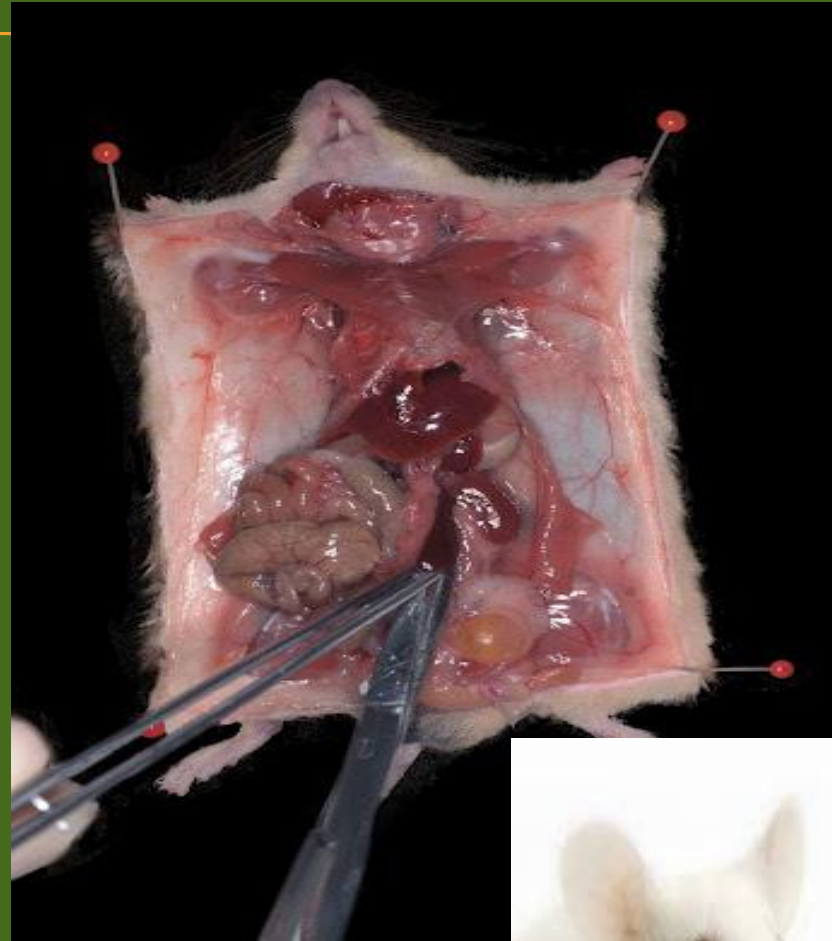
б/м до 21 суток, (3-4)

м/с - до 25 суток, (4-5)



Патоморфологические изменения:

- воспалительные изменения в месте заражения (плотный инфильтрат),
- увеличение и гиперемия л/у., надпочечников.
- уплотнение и увеличение селезенки и печени.
- резкая гиперемия сосудов подкожной клетчатки.
- гиперемия тонкого кишечника.



Из материала от биоп. животных делают:

- мазки-отпечатки по Романовскому-Гимзе и РИФ.
- посевы органов на питательные среды.
- готовят суспензию для иммун. методов.

Подготовка исследуемого материала к серологич.мет.иссл.

Бак. культуры (FT-агар). Из выросших культур готовят взвеси ($1,0 \times 10^9$ м.к./мл), прогревают при $t (100 \pm 1) ^\circ\text{C} - 20$ мин, с добавлением **формалина 2 %** и оставляют на **2 ч** при $t (22 \pm 4) ^\circ\text{C}$. Перед исследованием взвеси разводят до $5,0 \times 10^7$ м.к./мл.

Материал от животных растирают в ступке, добавляя 10-кратный объем **0,9 % NaCl с 2 % рас. формалина**, отбирают жидкую часть и **кипятят - 20 мин**, выдерживают **2 ч** при $t (22 \pm 4) ^\circ\text{C}$, фильтруют.

Объекты водной среды -отбирают 0,5 л, прогревают при $t (100 \pm 1) ^\circ\text{C} - 20$ мин, инактивируют **формалином до конечной концентрации 2 %** (на 500 мл пробы – 10 мл формалина) и оставляют на **2 ч при $t (22 \pm 4) ^\circ\text{C}$** .

Погадки заливают **1 % рас. формалина**, до избытка в 5-10 мл, и разминают. Отстаивания (**1-6 ч**), надсадочную жидкость отбирают, прогревают **при $t (100) ^\circ\text{C} - 20$ мин** фильтруют.

Субстрат гнезд, заливают **1 % рас. формалина** с избытком в 10-11 мл, через 1-2 ч отбирают над-ю жидкость, прогревают при $t (100 \pm 1) ^\circ\text{C} - 20$ мин и фильтруют.

РЕАКЦИИ НА ОБНАРУЖЕНИЕ АНТИГЕНОВ- РНАт, ИФА, РОА, РК ,РНГА,РТНГА

Иммуноферментный анализ (ИФА)

возможно обнаружение $n \times 10^3$ - $n \times 10^4$ в 1 мл.

Сертифицированная тест-система:

-ФКУЗ Ставропольский противочумный институт

Экспериментально-производственные серии:

-ГУ НИИЭМ им.Н.Ф. Гамалеи РАМН,

-ФКУЗ «Ростовский-на-Дону
противочумный институт»,

-ФГУ 48 ЦНИИ Минобороны

России (г. Киров).



Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА)

Чувствительность РНГА - $n \times 10^5$ – $n \times 10^6$ м.к./мл.

Сертифицированный диагностикум эритроцитарный тул.иммуноглобулиновый сухой и жидкий выпускают:

- ФГУ 48 ЦНИИ Минобороны России (г. Киров)
- ФКУЗ Ставропольский противочумный институт .

Реакция торможения непрямой гемагглютинации (РТНГА) –

ставят параллельно с РНГА. Если в РТНГА титр реакции по сравнению с РНГА снижен на 4-6 лунок, значит подтверждается специфичность РНГА.



Реакция нейтрализации антител (РНАт)-

высокая специфичностью и информативность.

Эритроцитарный антигенный тул. диагностикум:

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт.

Реакция **объемной агломерации (РОА).**

Основа диагностикумов для РОА:

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт»

выявляет не менее 8×10^5 м.к./мл возбудителя.

Исследование методом ПЦР.

используют генодиагностические препараты

(экспериментальные серии):

-«ГенТул» (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»)

-«АмплиСенс *F. tularensis* –FRT» - (ФБУН ЦНИИ

эпидемиологии).

РЕАКЦИИ НА ОБНАРУЖЕНИЕ АНТИТЕЛ-РА,РНГА,РТНГА,РНАг,ИФА

Наиболее эффективные и доступные методы :

-реакция агглютинации (**РА**)

- реакция непрямой гемагглютинации (**РНГА**).

РА служит для установления диагноза у больного и при изучении иммунол. состояния привитых.

Обнаружение агглютининов у больного обычно отмечается через 10 - 15 дней- 1:50 - 1:100

4 - 6 недель - 1:400 - 1:800.

6 - 12 месяцев -1:100 - 1:400

У привитых через 4 - 6 недель -1:160 - 1:320, затем снижаются до 1:10 - 1:40 и обычно выявляются в течение 5 - 7 лет.

Антиген – тул. диагностикум (убитая формалином взвесь тул. бактерий вакцинного штамма (1 мл -25 млрд. тул. бак)

Реакция непрямой гемагглютинации (**РНГА**) –чув. метод для ранней и ретроспективной диагностики, для определения иммун. состояния привитых. **Диэг. титр при исследовании первичных сывороток -1:200 и более. Обязательно подтверждение нарастания титра (в 2-4 р).**

У больных Ат обнару-я в конце 1-й недели заб-я, через 1 - 1,5 достигают -1:10000 - 1:20000, после снижаются до 1:100 - 1:200 и сохраняются длительное время.

У привитых Ат обнару-я в титрах, -1:2000 - 1:5000, через 1 - 1,5 месяца достигают 1:20 - 1:80 и сохраняются в течение нескольких лет.

Антигены -формализированные эритроциты барана, сенсibilизированные тул. антигеном.

Реакция нейтрализации антигена (РНАг)

РНАг применяется для подтверждения РНГА. РНАг выявляет как полные, так и не полные - блокирующие **Ат**.

Механизм реакции состоит в специфической нейтрализации Аг антителами иссл. материала.

Если в исследуемой сыворотке есть Ат, то в первых лунках, они полностью нейтрализуют Аг. Эритроциты не агглютинируются и оседают на дно лунок (пуговка). Результат отмечается как «+», а в протоколах (-). Максимальное разведение сыворотки (последняя лунка, в которой отсутствует агглютинация эритроцитов) оценивается как титр реакции.

При отсутствии в исследуемой сыворотке Ат наблюдается агглютинация эритроцитов во всех лунках (зонтик). Результат отмечается как (-), а в протоколах (+).

ИФА

- для диагностики у больных и переболевших.
- определения иммунитета у вакцинированных.

У больных Ат обнаруживаются между 6 - 10 днями, затем уровень их снижается, но они выявляются более 10 лет.

Титры антител у больных и вакцинированных колеблются от 1:400 до 1:40000 и выше и, как правило, в 10 - 20 раз превышают таковые в РА и РНГА.

Диагностическим титром в ИФА считают разведение сыворотки 1:400 и выше.

АЛЛЕРГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА

У больных кожная аллер. реакция «+» с 3 - 5 суток.
Аллергический ответ у вакцинированных сохраняется 5 - 6 лет.

Для внутрикожной пробы -внутрикожный тулярин -
взвесь тул. бак. вакц. штамма, убитых нагреванием
при 70 °С в течение 1 ч.

В 1 мл -**500 млн.** убитых бактерий(10 человеко-доз).

Тулярин (0,1 мл) вводят стер. шприцем внутрь кожи
левого предплечья (на границе верхней и средней
трети). На месте введения образуется беловатый
пузырек (3 - 4 мм), который через 30 мин.
рассасывается.

Учет и оценка реакции 24 - 48 ч.

При «+» реакции через 6 - 10 ч.
- гиперемия и инфильтрат не менее 0,5 см.

При «-» результате
-изменения кожи в виде гиперемии без инфильтрата, исчезающие через 48 ч.,

«-» результат мог быть обусловлен ранним сроком от начала заболевания. Так, аллер. реакция может запаздывать при тяж. формах или при раннем применении антибиотиков.

Для **накожной пробы** - **накожный тулярин** - **взвесь тул. бак. вакц. штамма, убитых** **нагреванием при 70 °С (1 ч).**

В 1 мл - **10 млрд.** убитых бактерий (20 человеко-доз).

Предназначен для определения иммунитета у привитых или для ретроспективного обслед-я.

Одну каплю тулярина пипеткой наносят на кожу левого плеча в его средней трети. Через каплю скарификатором делают 2 параллельные насечки (8 - 10 мм), с расстоянием в 5 мм, до появления росинок крови. Затем тулярин тщательно втирают.

Учет и оценка реакции.

Учет через 48 – 72 ч. Реакция ярко выражена и далее постепенно угасает, полностью исчезая к 7 - 10 дню. Реакцию считают «+» при величине реагирующего участка кожи не менее 0,5 см и наличии вдоль насечек ясного покраснения и отечности .

Реакция лейкоцитоллиза (РЛ) основана на учете разрушения лейкоцитов сенсibilизированного организма под влиянием специфического аллергена (антигена). Реакция лизиса лейкоцитов становится «+» уже в первые дни после вакцинации или заболевания (3 - 4 день), удерживается в течение многих лет (у переболевших - до 40 лет).

Идентификация выделенной культуры :

- 1) морфология и окраска бактерий в мазках и специфическое свечения в РИФ (МФА);
- 2) характер роста на пит.средах (на свернутой желточной среде Мак-Коя);
- 3) отсутствие роста на простых пит. средах типа мясopептонного агара или бульона;
- 4) агглютинация специфической туляремийной сывороткой (ФГУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»);
- 5) патогенность для б/м и м/с;
- 6) выявление в ПЦР видоспецифичных ДНК-мишеней.

ВНУТРИВИДОВОЕ ТИПИРОВАНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУЛЯРЕМИИ

- ферментация глицерина,
- цитруллинуреидазная активность,
- фосфатазная активность,
- пенициллиназная активность,
- вирулентность для кроликов,
- выявление подвидспец. генет. маркеров с помощью ПЦР.

Для определения подвигов используют следующие тесты:

1. **ферментация глицерина** Производят засевают культуры и инкубируют при 37 °С в течение 48 ч.
голарктические штаммы - неферментирующие глицерин не изменяют окраску среды (красная) (-)
неарктические и среднеазиатские –глицерин-положительные окрашивают среду в желтый цвет (+)

2. **цитруллинуреидазная активность**

голарктические штаммы - не синтезируют и реакционная смесь остается бесцветной (-)
неарктические и среднеазиатские - обладают цитруллинуреидазной активностью и разлагают цитруллин до орнитина (розовой окраски) (+)

3. фосфатазная активность

голарктические штаммы- окраску реакционной смеси не изменяют (-).

Неарктические и среднеазиатские штаммы- обладающие фосфатазной актив., окрашивают раствор в ярко-малиновый цвет (+).

4. пенициллиназная активность

голарктические и неарктические культуры - в желтый (-).

среднеазиатские штаммы окрашивают пробы в темно-красный цвет (+).

5. вирулентность для кроликов,
1 м.к. неарктического штамма вызывает
заболевание со смертельным исходом.
При инфицировании культурами голаркти-
ческого или среднеазиатского подвидов даже
в дозе 1×10^6 м.к. животные выживают.

6. выявление подвидспецифичных
генетических маркеров с помощью ПЦР.

В основе метода лежит амплификация
специфичных для каждого подвида
фрагментов области дифференциации генома
F. tularensis RD1.

Бубонная форма возникает если внедрение микробов произошло через кожу. Увеличиваются ближайшие л/у, позже в процесс могут вовлекаться и удаленные узлы.

• **Язвенно-бубонная** форма чаще развивается при заражении от укуса насекомого. Помимо бубона в месте укуса появляется неглубокая язва с приподнятыми краями, покрытая на дне темной корочкой.

• **Глазо-бубонная** форма - при проникновении возбудителя через конъюнктиву. Характерны эрозии и язвы конъюнктивы с отделением желтого гноя, бубоны близлежащих лимфоузлов.

• **Ангинозно-бубонная** форма - при употреблении инфицированной воды и пищи. Протекает в виде тяжелой ангины с некрозом миндалин, бубонами в подчелюстной, шейной и околоушной областях.

• **Абдоминальная** форма развивается вследствие поражения л/сосудов брюшной полости. Проявляется сильными болями в животе, тошнотой, рвотой, диареей.

• **Легочная** форма возникает при вдыхании возбудителя. Могут поражаться л/у трахеи, бронхи, или развивается очаговая пневмония (протекает довольно тяжело и имеет склонность к развитию осложнений).

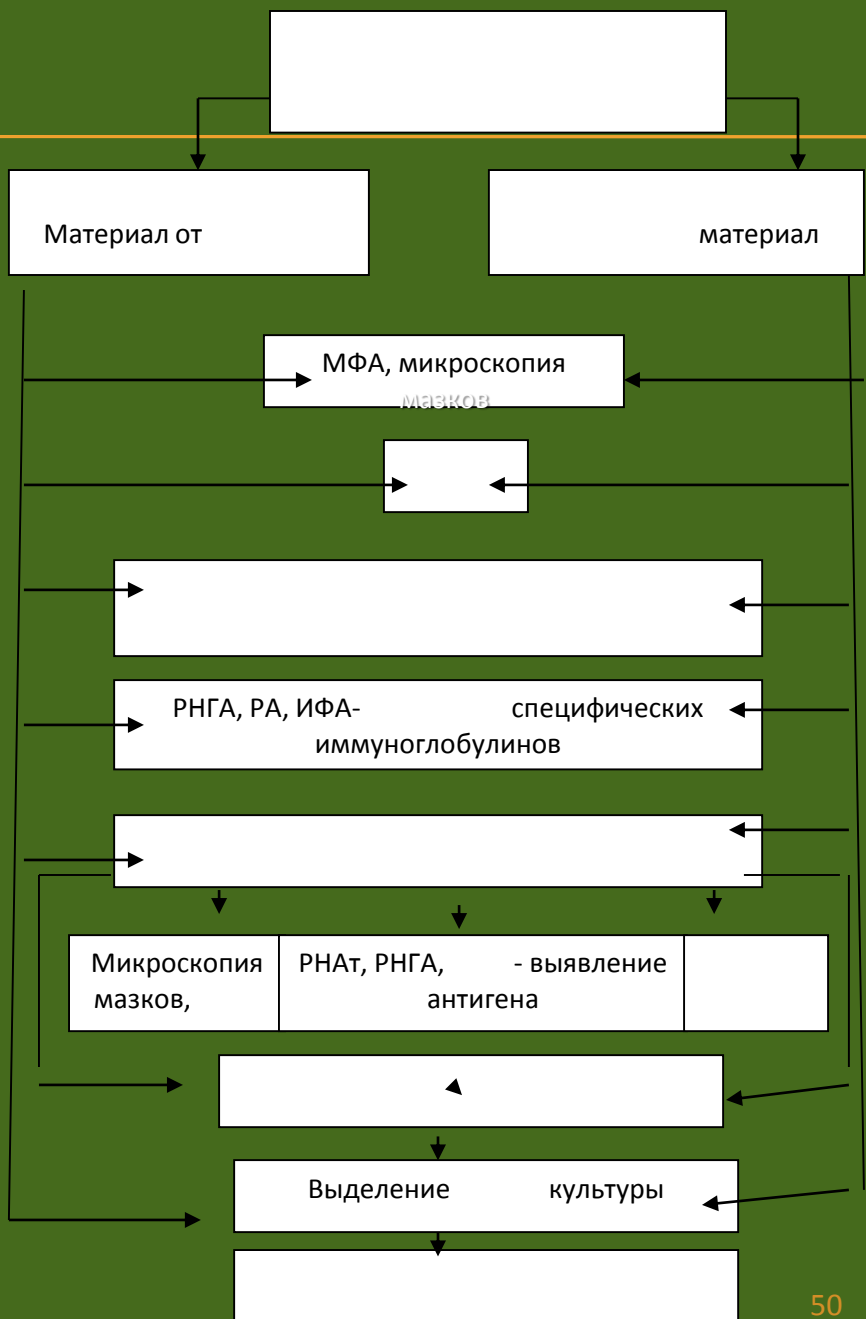
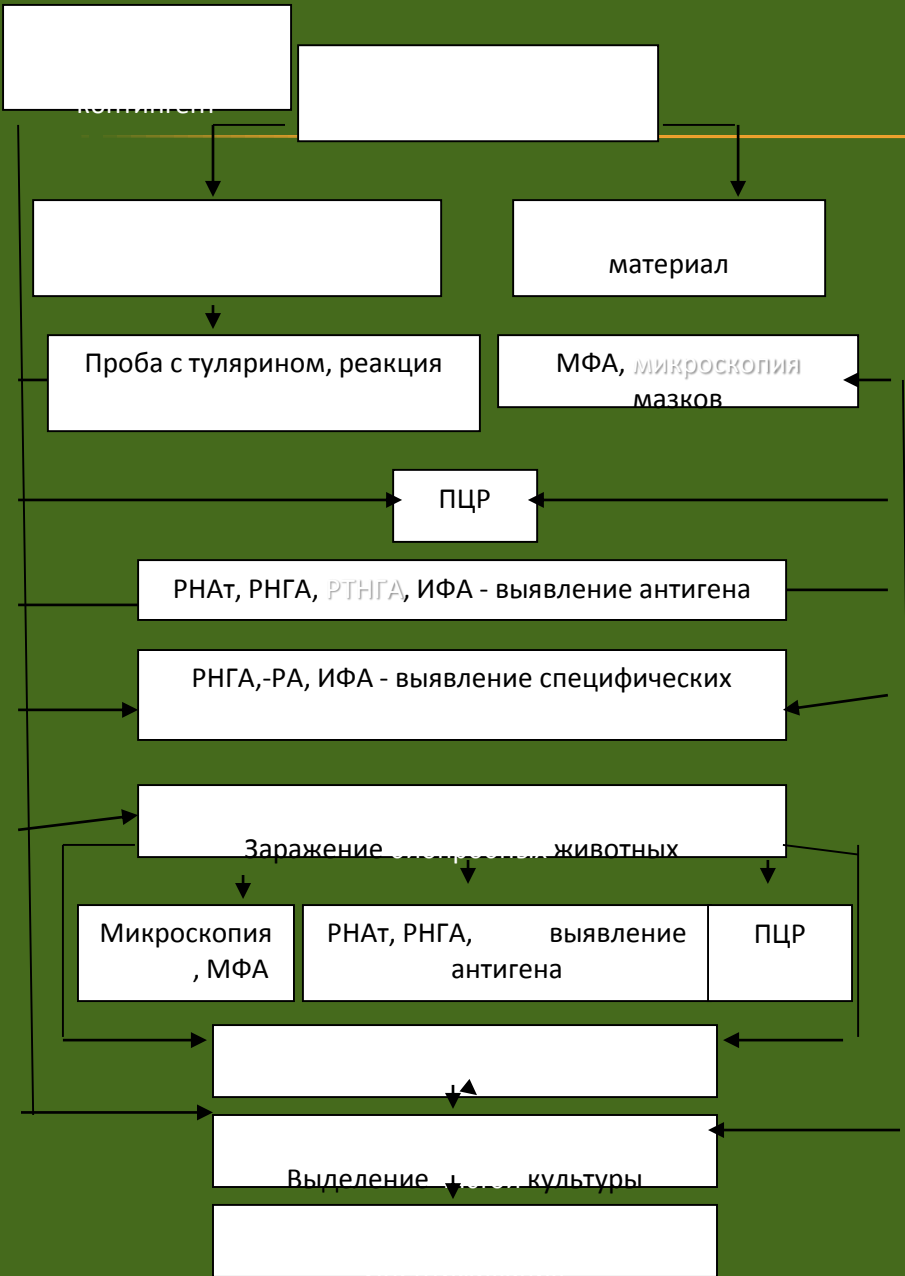
• **Генерализованная** форма напоминает тяжелый сепсис. Выражены симптомы интоксикации: тяжелая лихорадка, слабость, озноб, головная боль. Могут возникнуть спутанность сознания, бред, галлюцинации. Возможно появление стойкой сыпи по всему телу, бубонов различных локализаций, пневмонии. Эта форма может осложняться инфекционно-токсическим шоком.

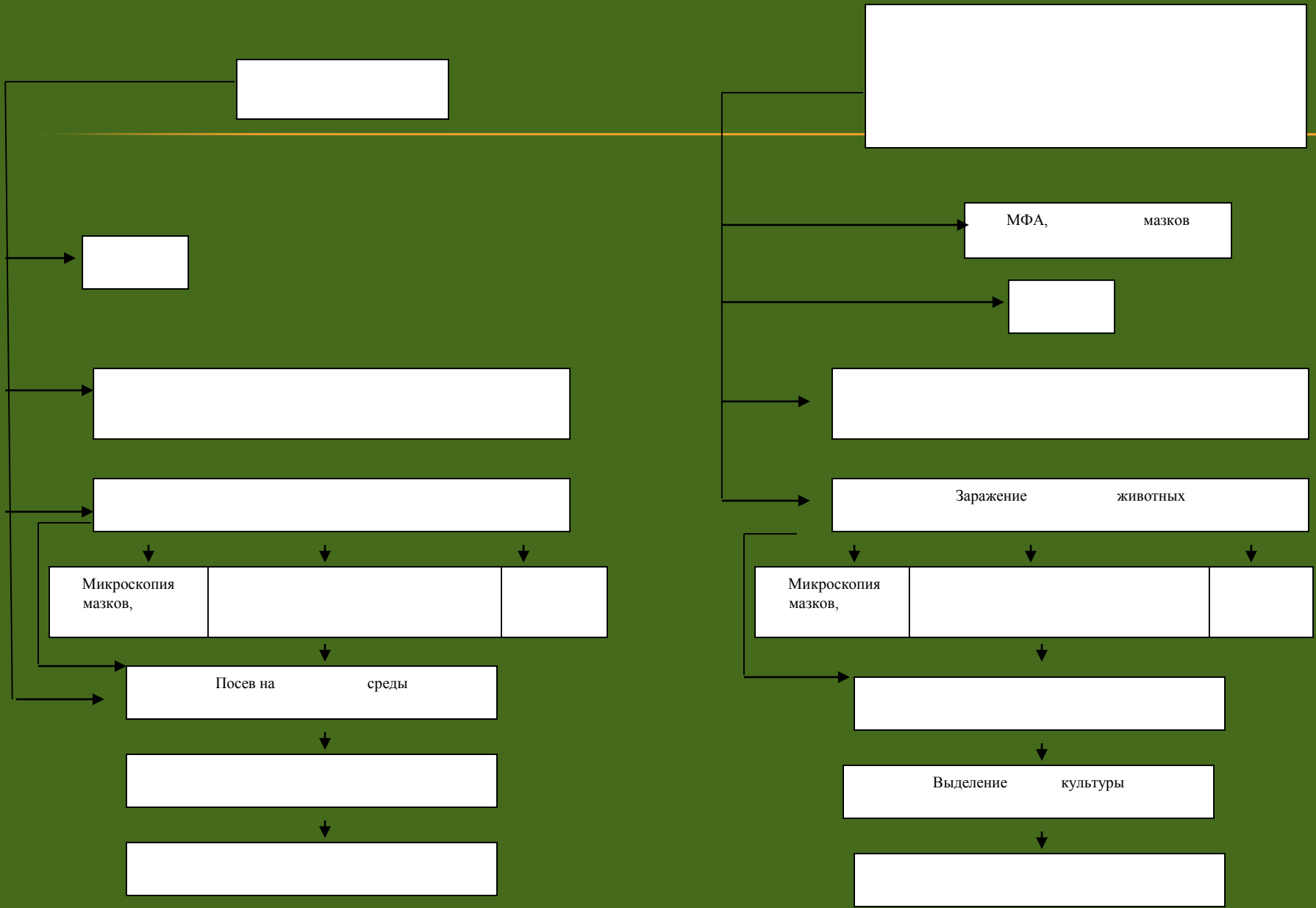
Признак	Подвиды <i>Francisella tularensis</i>			
	<i>nearctica*</i>	<i>holarctica</i>	<i>Mediasiatica</i>	<i>novicida</i>
1	2	3	4	5
Размер, мкм	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 1,5
Наличие капсулы	+	+	+	-
Тинкториальные свойства	Гр ⁻	Гр ⁻	Гр ⁻	Гр ⁻
Подвижность	-	-	-	-
Рост на стандартных средах	-	-	-	+ (-)
Рост на среде с цистеином	+	+	+	-
Рост в пит. бульоне, 0 % NaCl	-	-	-	-
Рост в пит. бульоне, 6 % NaCl	-	-	-	+(-)
Оптимальная t, °C	37	37	37	37
Образование H ₂ S на среде с цистеином	+	+	+	+
Образование H ₂ S на станд. средах	-	-	-	-
Образование индола	-	-	-	-
Образование уреазы	-	-	-	-
Восстановление нитратов	-	-	-	-
β-лактамазная активность	+	+	-	+
Ферментация до кислоты:				
мальтозы	+	+	-	+ (-)
лактозы	-	-	-	-
сахарозы	-	-	-	+
D-глюкозы	+	+	-	+
глицерина	+	-	+	+ (-)
Продукция цитриуллинуреидазы	+	-	+	+

Аденозиндифосфатазная активность	+	-	+	+
Агглютинабельность с противотул. сывороткой	+	+	+	+(-)
Юль % G+C ДНК	33-36	33-36	33-36	34
% гомологии по гену 16 рРНК с <i>F. tularensis</i> ТСС 6223	≥99,8	≥99,8	≥99,8	≥99,8
Наличие гена Ipn, кодирующего синтез белка молекулярной массой 17 кДа	+	+	+	+
LD₅₀ для кроликов, м.к.	< 10¹	> 10⁶	> 10⁶	> 10⁶
Минимальная заражающая доза для крышей, м.к.	1-10	1-10	1-10	> 10³
Реал распространения	Только на территории Северной Америки	Северного полушария, за исключением Англии, Исландии и Португалии.	Район поймы рек Чу и Или (Казахстан) и дельты реки Амударья (Узбекистан).	Только на территории Северной Америки

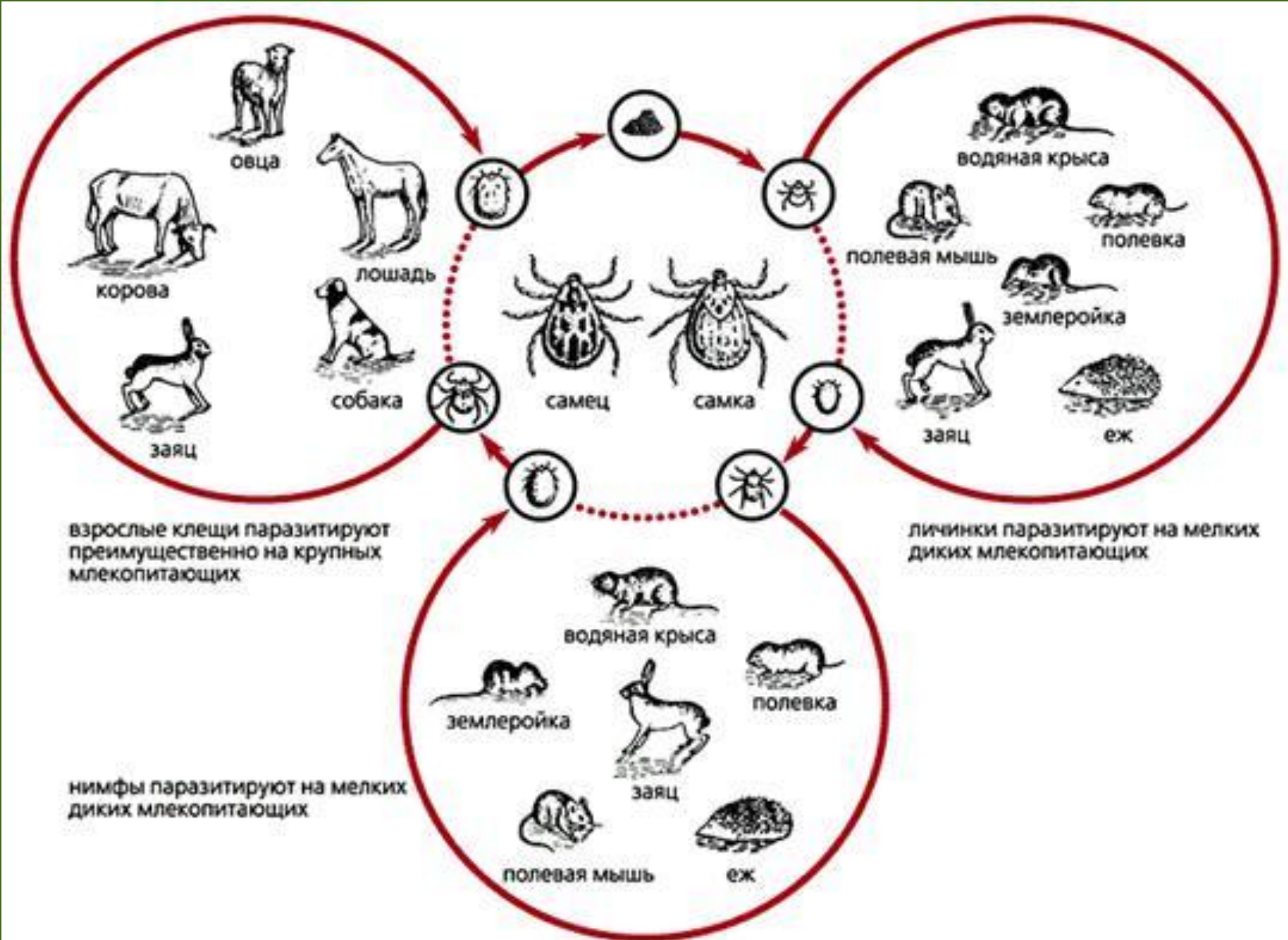
Схема 6.3. ЛАБОРАТОРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА НА ТУЛЯРЕМИЮ











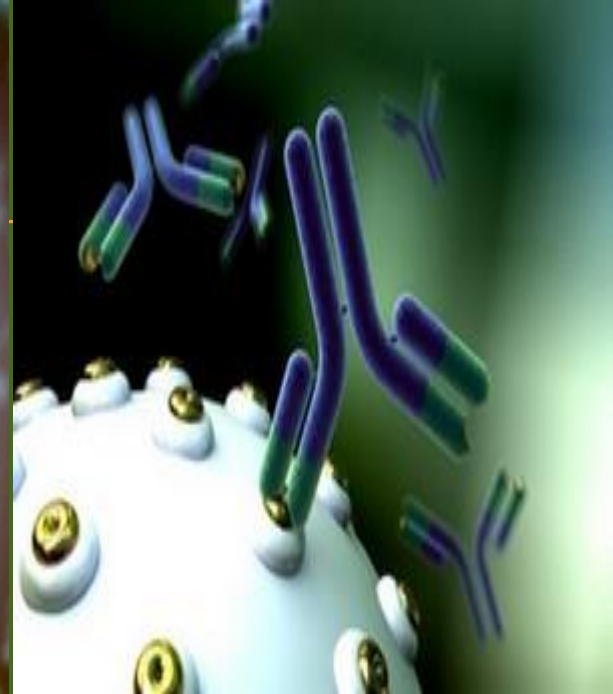
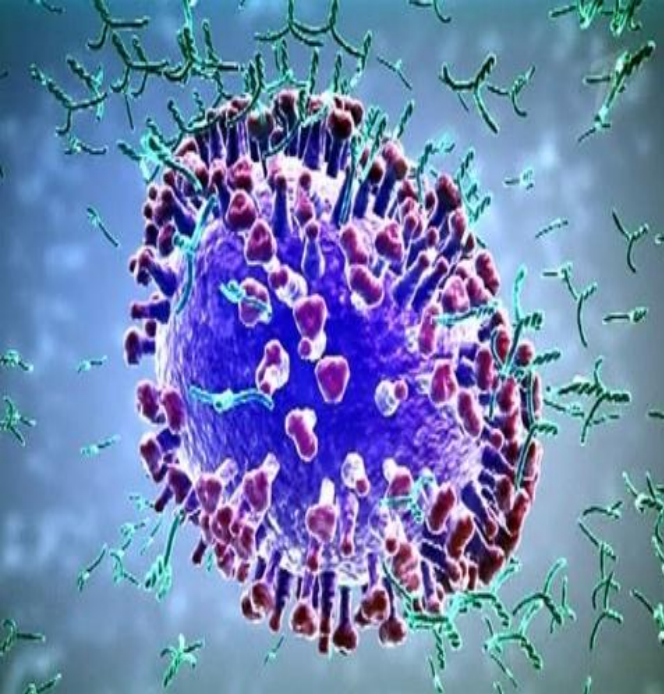






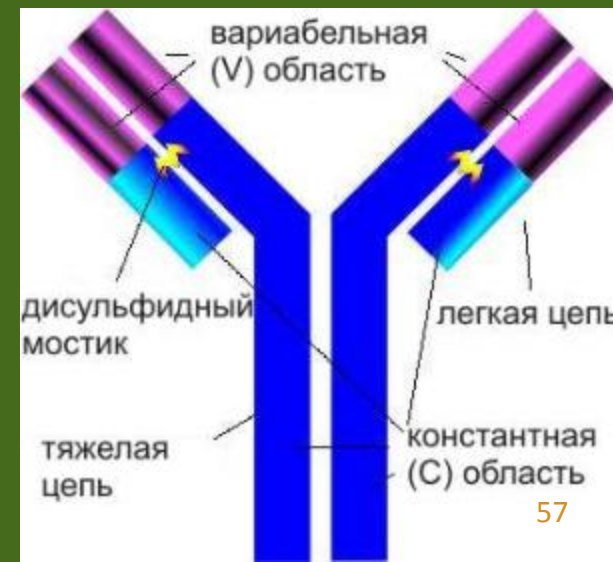
Антигены — чужеродные вещества (белки или полисахариды), которые организм блокирует выработанными антителами.

В настоящее время известно, что иммунная система состоит не только из антител. Иммуногены — это вещества (свои или чужие), которые вызывают ответ иммунной системы. Антигены, как правило, являются белками или полисахаридами и представляют собой части бактериальных клеток, вирусов и других микроорганизмов. Липиды и нуклеиновые кислоты проявляют антигенные свойства в сочетании с белками. Однако простые вещества, даже металлы, также могут становиться антигенами в сочетании с собственными белками человеческого организма и их модификациями. Они называются гаптены (haptens).



Антитела (Ig) — это растворимые гликопротеины, присутствующие в сыворотке крови, тканевой жидкости или на клеточной мембране, которые распознают и связывают антигены.

Схема строения антитела. Антитело состоит из четырех белковых молекул — двух больших, или «тяжелых» цепей и двух маленьких («легких»). Вариабельная область отвечает за связывание антигена, именно в нее вносятся изменения при соматическом гипермутировании.



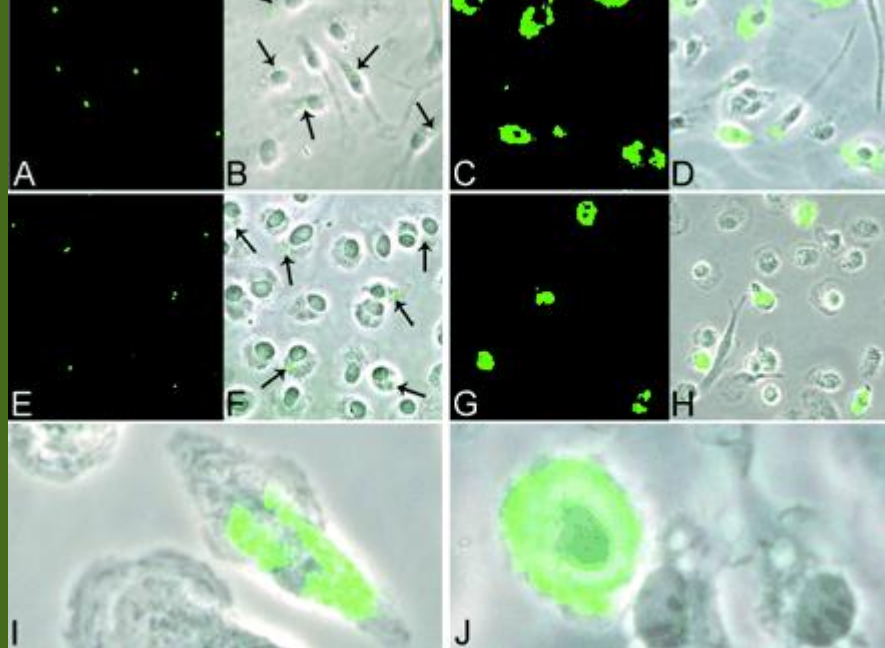
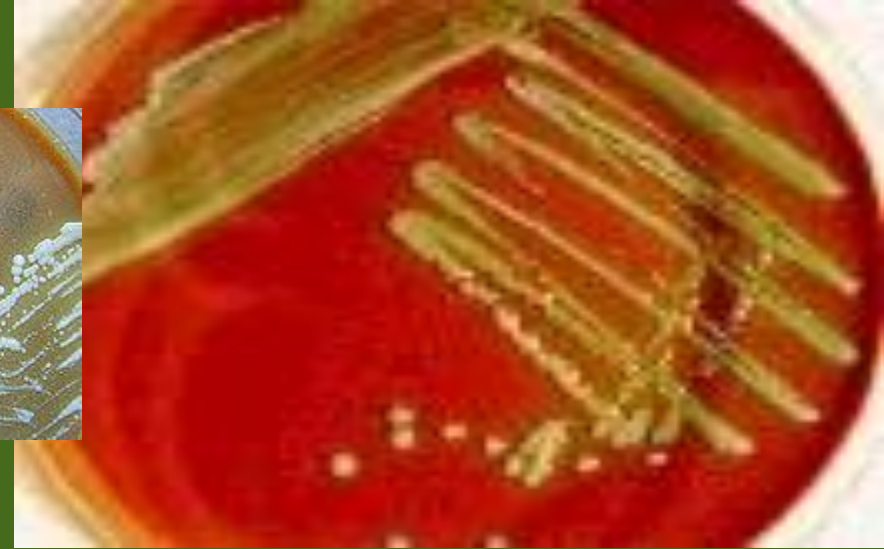


Рисунок 1. *F. tularensis* LVS повторяет в мышинных и человеческих макрофагах. Искусственный tuBMDM или huMDM инкубировали в течение 2 ч с LVS в МВД 50 и 5 соответственно. Некоторые образцы были затем промывают и фиксируются немедленно, тогда как другие промывают и выдерживают в течение еще 16 часов. Бактерии были обнаружены непрямой иммунофлуоресценции, а также образцы были визуализированы эпифлуоресцентной (A, C, E, G) и фазовой микроскопии. Некоторые панели изображают epifluorescent микроскопических изображений накладываются на этапе микроскопических изображений одного и того же поля (B, D, F, H, I, J). Стрелки показывают примеры интернализированной бактерии (B, F). Через два часа после того, как бактерии были добавлены в макрофаги, небольшое число *F. tularensis* LVS были замечены связанные с tuBMDM (A, B) и huMDM (E, F). Шестнадцать часов, tuBMDM (C, D) и huMDM (G, H), содержащиеся заметно увеличилось количество бактерий. Увеличенный просмотр подтверждает обширные внутриклеточных репликации LVS после 16 часов в huMDM (I) и tuBMDM (J).



F. tularensis Schu шоколадный агар, 72 часов

F. tularensis изолировать на агаре CHAB.
Опаловое, пурпурно блеск при



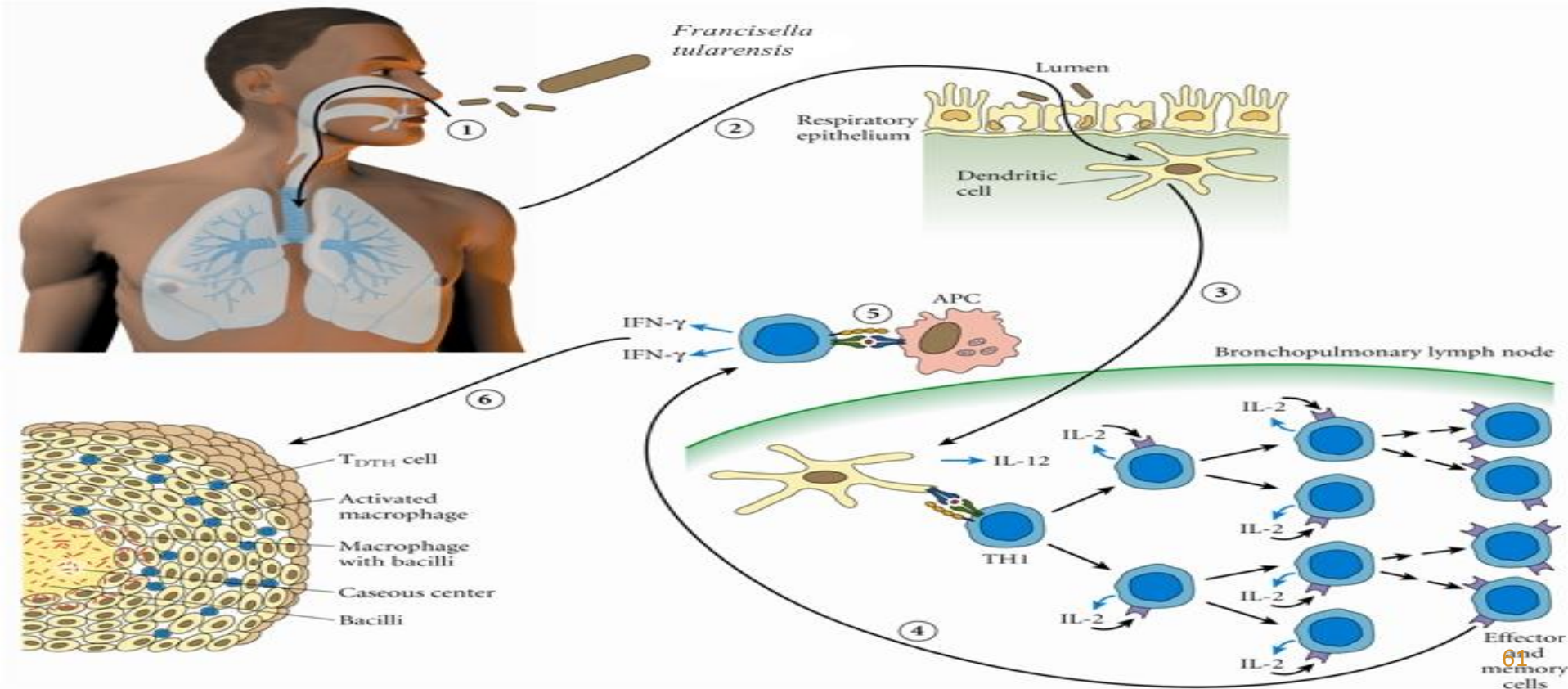
F. tularensis Schu 6% агара овец крови (SBA),
72 часов.

F. tularensis Schu цистеина агар с 9%
chocolatized крови овец, 72 часов

В *tularensis* не растет решительно в бульоне, даже если среда дополнить экзогенного цистеина (1% IsoVitaleX). Организм растет медленно и привитых бульон потребностей, которые должны соблюдаться в течение 10 дней. Рост рассматривается как небольшое помутнение всей среды в ВНІ или ВВО. В thioglycollate бульон, рост видно сначала плотно полоса в верхней, что диффундирует всей среды, культура растет (рис. 3б). Доказательства роста должен сопровождаться грамм окрашивания и субкультуры на цистеин-содержащих агаром.

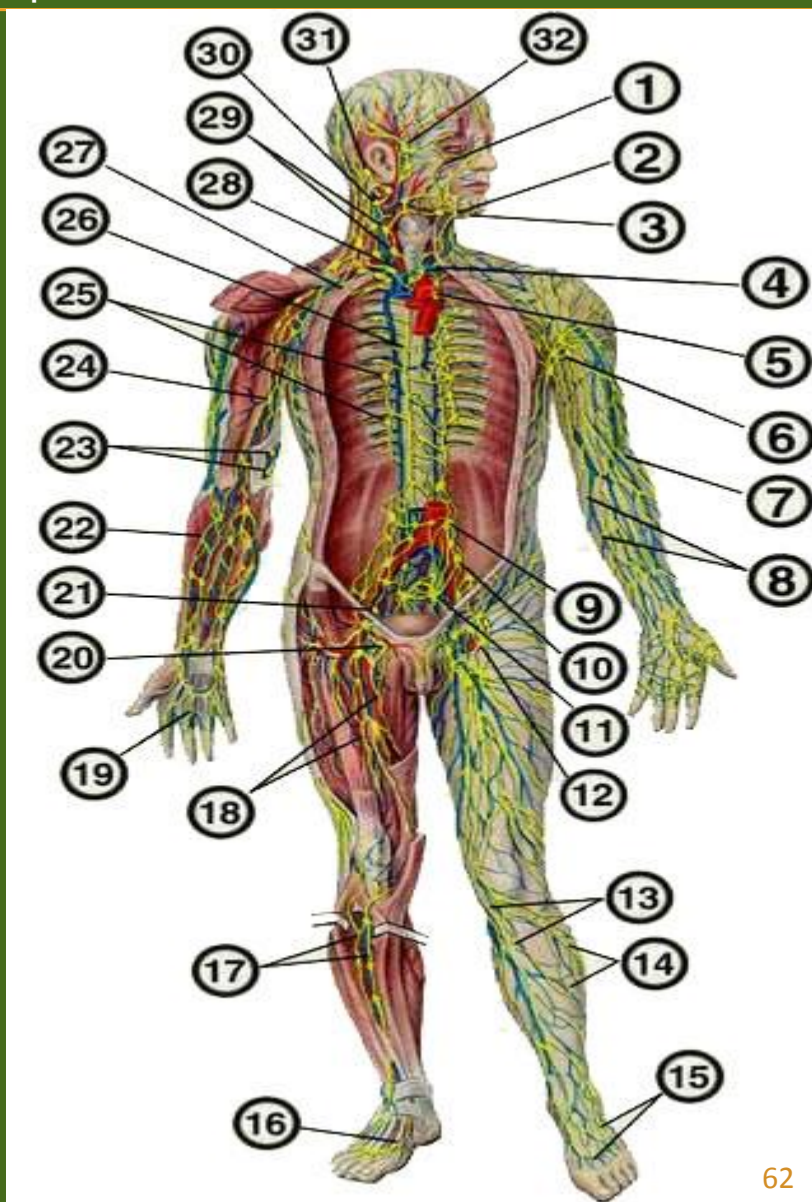


Francisella tularensis поступает в дыхательные пути и (2) собственной пластинки от респираторных бронхиол с помощью клеток М (3) дэндрижестом антиген занимают дендритные клетки, дендритные клетки поездки в регионарные лимфатические узлы и настоящего *F.tularensis* антигенов Т-хелперов 1 клеток (4) Т-хелперов 1 клетки размножаются, они могут вернуться в места заражения, (5) рестимуляции местных антиген представляющих клеток приводит к интерферон- γ активации макрофагов и продукции, (6) Отказ очистить *F. Tularensis* результатов в формировании гранулемы.



Лимфатическая система (лат. *systema lymphaticum*) — часть сосудистой системы млекопитающих, дополняющая сердечно-сосудистую систему. Она играет важную роль в обмене веществ и очищении клеток и тканей организма. В отличие от кровеносной системы лимфатическая не является закрытой и не имеет центрального насоса.

- 1 — лимфатические сосуды лица;
- 2 — подчелюстные лимфатические узлы;
- 3 — подбородочные лимфатические узлы;
- 4 — устье грудного протока;
- 5 — передние грудостенные лимфатические узлы;
- 6 — подмышечные лимфатические узлы;
- 7 — поверхностные лимфатические сосуды руки, следующие по ходу латеральной подкожной вены;
- 8 — медиальная группа поверхностных лимфатических сосудов руки;
- 9 — поясничные лимфатические узлы;
- 10 — общие подвздошные лимфатические узлы;
- 11 — внутренние подвздошные лимфатические узлы;
- 12 — поверхностные паховые лимфатические узлы;
- 13 — медиальная группа поверхностных лимфатических сосудов голени;
- 14 — латеральная группа поверхностных лимфатических сосудов голени;
- 15 — поверхностные лимфатические сосуды стопы;
- 16 — глубокие лимфатические сосуды тыла стопы;
- 17 — глубокие лимфатические сосуды голени;
- 18 — глубокие лимфатические сосуды бедра;
- 19 — глубокие лимфатические сосуды ладони;
- 20 — глубокие паховые лимфатические узлы;
- 21 — наружные подвздошные лимфатические узлы;
- 22 — глубокие лимфатические сосуды предплечья;
- 23 — поверхностные локтевые лимфатические узлы;
- 24 — плечевые лимфатические узлы;
- 25 — межреберные узлы;
- 26 — грудной поток;
- 27 — подключичный ствол;
- 28 — времный ствол;
- 29 — глубокие шейные лимфатические узлы;
- 30 — временно-двубрюшный лимфатический узел;
- 31 — позадиушной лимфатический узел;
- 32 — околоушные лимфатические узлы.



Лимфатические узлы

