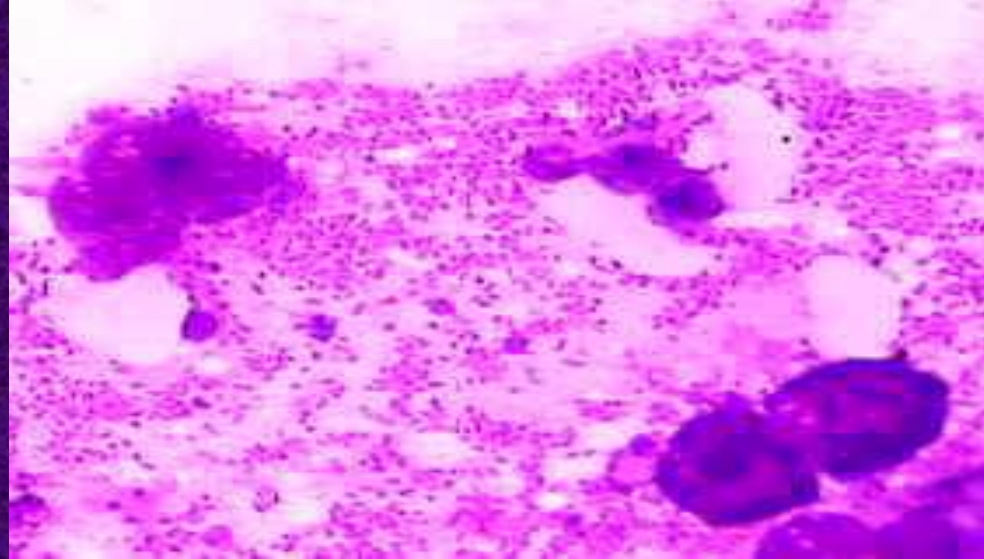
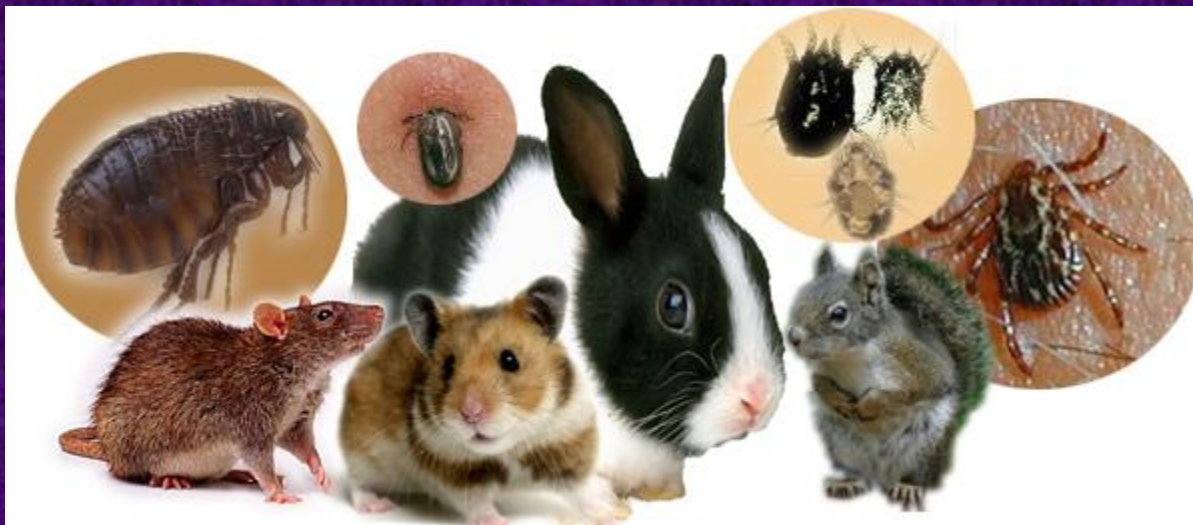


**Лабораторная диагностика
особо опасных инфекций
(чума, туляремия)**



Лабораторная диагностика туляремии



Туляремия - зоонозная системная природно-очаговая бактериальная инфекционная болезнь, характеризующаяся симптомами общей интоксикации, лихорадкой, воспалительными изменениями в области ворот инфекции, регионарным лимфаденитом, склонностью к затяжному течению.

Возбудитель туляремии
впервые
был выделен в 1911 г.
Дж. Мак-Коем и Ч.Чепиным
при изучении заболеваний
среди сусликов в США в районе
калифорнийского озера Туляре.

Классификация:

Подкласс : *Proteobacteria*

Семейство: *Francisellaceae*

Род: *Francisella*

Вид: *Francisella tularensis*

Francisella tularensis

<i>tularensis</i> (<i>nearctica</i>) (тип А)	<i>holarctica</i> (тип В)			<i>mediasia- tica</i>	<i>novici- da</i>
	<i>Japo- nica</i>	biovar I eryS	biovar II eryR		

В пределах рода выделяют также виды
F. philomiragia и *F. hispaniensis*

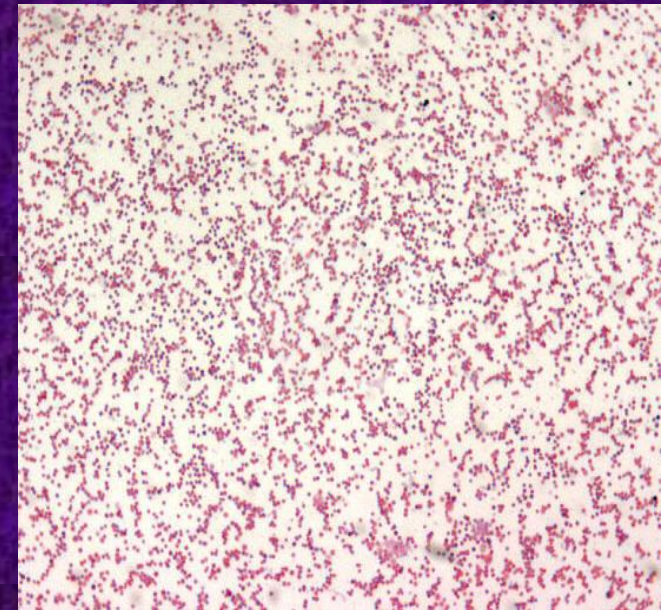
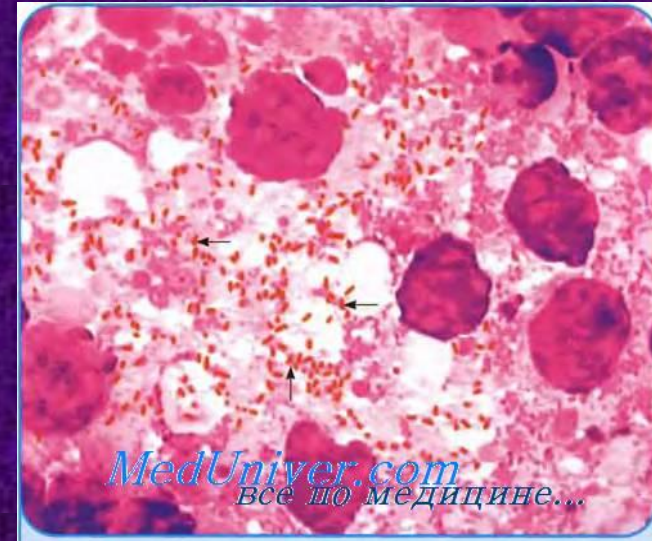
Морфология:

Грамотрицательная бактерия, имеет кокковидную или палочковидную форму 0,3-0,7 мкм в длину и 0,2-0,4 мкм в ширину. Микроб неподвижен, спор не образует, имеет небольшую капсулу.

Мазки-отпечатки из органов по Романовскому-Гимзе, отличаются от другой (посторонней) флоры более нежной фиолетовой окраской и мелкими размерами, биполярно не окрашиваются.

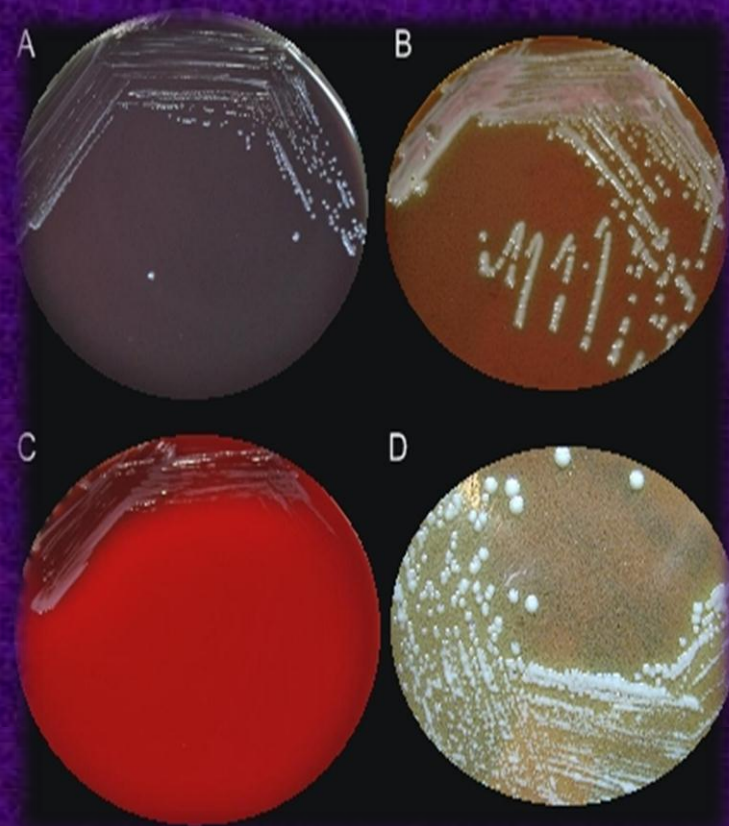
При культивировании на:

- искусственных питательных средах микроб имеет формы очень мелкого кокка
- в препаратах из культур - шаровидные и нитевидные формы
- в органах животных чаще встречаются палочковидные



Франциселлы - факультативные анаэробы; температура культивирования 37 °С. Для культивирования применяют сложные среды с добавлением экстрактов тканей, крови и антибиотиков, подавляющих рост других микроорганизмов.

На плотных средах образуют мелкие колонии беловато-голубоватого цвета. В жидких средах размножаются хуже и только у поверхности среды. Не растут на универсальных питательных средах.



Свернутая желточная среда Мак-Коя: при обильном посеве 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, гладкие.

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.

Среды АДТ и СКТ: рост единичных туляремийных микробных клеток 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 и др.

Биохимические свойства

Определение ферментации углеводов (сахара, спирт) проводят в специальной **жидкой среде для определения ферментации углеводов F. tularensis.** или среде Dawns.

Способность сбраживать углеводы и спирты у туляремийного микроба ограничена.

Микроб ферментирует с образованием кислоты без газа:

- глюкозу, мальтозу, в ряде случаев - левулезу и маннозу;
- образует сероводород и редуцирует тионин, метиленовый голубой, малахитовый зеленый.

Не сбраживает лактозу, сахарозу, рамнозу, маннит.

Индол не образует .

Внутривидовые таксоны *F. tularensis*

Подвиды	Патогенность		Фементация глицерина	Цитруллин- уреидаза
	Для человека	Для животных		
<i>F. tularensis tularensis</i>	Высокая	Высокая	+	+
<i>F. tularensis holartctica</i>	Умеренная	Умеренная	-	-
<i>F. tularensis var. japonica</i>	Умеренная	Умеренная	+	-
<i>F. tularensis mediasiatca</i>	Умеренная	Умеренная	+	+
<i>F. tularensis novicida</i>	Известна недостаточ но	Низкая	вариабель- но	+

Вирулентность туляремийного микроба зависит от его подвида.

Подвид *tularensis* (тип А):

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

Подвиды *holarctica* (тип В), *mediasiatica*:

LD_{50} для кроликов $> 10^6$ м.к., характеризуется меньшей вирулентностью.

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

Антигенная структура

Антигены туляреимийного микроба – это прочное соединение липидного и белкового компонентов с полисахаридом и нуклеопротеидами.

Вирулентные туляреимийные бактерии (S-культура) содержат два антигенных комплекса:

Vi-комплекс - «поверхностно-соматический» содержит липиды и белки;

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

С утратой Vi-комплекса бактерии становятся авирулент-ными и неиммуногенными. После обработки микробных клеток S-штаммов Vi-сывороткой у них выявлялся капсулоподобный покров.



Геном туляремийного микроба представлен молекулой ДНК, размер которой около 1830 т.п.н. У большинства *Francisella spp.* не обнаружены собственные плазмиды. Исключение составляет только *F. novicida*, у которой обнаружена мелкая критическая плазида pFN.

На хромосоме туляремийного микроба располагается остров патогенности FPI (от англ. - pathogenicity island of *F. tularensis*) размером 30 т.п.н. В его состав входят оперон *iglABCD*, отвечающий за синтез белков, играющих решающую роль в персистенции возбудителя в макрофагах, и оперон *pdp ABC* (от англ. - pathogenicity determinant protein), продукты которого необходимы туляремийному микробу для проявления патогенных свойств.

Устойчивость к физическим и химическим факторам:

- в зерне и соломе при 0 °С до 6 мес,
- в замерших трупах животных - до 8 мес. при комнатной температуре в течение 5-10 сут.
- в высушенных шкурках при 15-20 °С - до 20 сут.
- кипячение убивает моментально, а при 60 °С - гибнет в течение 20 мин.
- под действием солнечных лучей погибают в течение 30 мин.
- на рассеянном свете жизнеспособность до 3 дней.
- в замороженной воде - до 10 мес.
- во влажной почве при 4 °С - > 4 мес.
- в молоке, сливках при 15 °С - до 8 сут; в замороженном - 3 мес.
- микроб не стоек к лизолу, фенолу, хлору, сулеме
- особенно чувствителен к этиловому спирту - менее 1 мин.
- чувствителен к аминогликозидам (стрептомицин, гентамицин, канамицин), тетрациклинам, хлорамфениколу и хинонам, но резистентен к пенициллинам, цефалоспорином и полимиксину.

Возбудитель туляремии является внутриклеточным паразитом.

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.

При эпизоотологическом обследовании:

- дикие млекопитающие или их трупы,
- гнезда грызунов,
- погадки птиц, помет хищников и млекопитающих,
- солома, талая вода и др.,
- вода из водоемов и колодцев,
- гидробионты, членистоногие, эктопаразиты,
- кровососущие двукрылые.



Первая группа. Высоковосприимчивые и высокочувствительные млекопитающие (заражаются при попадании в организм единичных микробных клеток возбудителя туляремии, остро болеют и быстро погибают с интенсивным обсеменением органов и тканей возбудителем). К этой группе относятся все виды мелких мышевидных грызунов, кроме полевой мыши, зайцеобразные и насекомоядные, за исключением ежей, куторы, выхухоли.

- *Вторая группа.* Высоковосприимчивые, но малочувствительные млекопитающие (заражаются при попадании в организм единичных микробных клеток возбудителя туляремии, болеют тяжело, но быстро освобождаются от микроба, приобретая устойчивый иммунитет). К этой группе относятся полевая мышь, все виды крыс и сусликов, белки, бурундуки, бобры, ежи, выхухоль, кутора, белозубка и некоторые другие виды млекопитающих.

- *Третья группа.* Маловосприимчивые и практически нечувствительные млекопитающие. К ним относится большинство хищных млекопитающих и сельскохозяйственных животных.

СБОР И ДОСТАВКА МАТЕРИАЛА В ЛАБОРАТОРИЮ

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



Затем взвешивают с точностью до 0,5 г, измеряют длину тела, хвоста, высоту уха и др., определяют пол, возраст и генеративное состояние.

Возможна обработка зверьков на месте сбора, вскрытие и помещение органов в консервант (вазелино-парафиновая смесь) для доставки в лабораторию.

Трупы зверьков, погибших в природе, павших в лаборатории, или животных, у которых обнаружены патолого-анатомические изменения, подвергают индивидуальному исследованию, применяя биологический, бактериологический, молекулярно-генетические, серологические методы.

У животных с признаками **разложения** исследуют костный мозг трубчатой кости.

Для **сильно разложившихся** трупов применяют накожный метод постановки биопробы.

Мумифицированные трупы, высохшие шкурки и кости зверьков исследуют в ПЦР, РНАт, МФА и др., позволяющих обнаружить туляремийный антиген.

Основным методом исследования мышевидных грызунов, добытых в природе орудиями лова или живыми, служит биопроба. Применяют групповое исследование (5-10) одного вида и пойманных в одном месте. Используют кусочки селезенки, печени, почек, л/узлы, костный мозг. Органы животных, у которых на вскрытии обнаружены патолого-анатомические изменения, исследуют индивидуально, применяя дополнительно посев и бактериоскопию.

Животных, добытых живыми исследуют на наличие антител, используя сыворотку крови (консервируют мертиолатом натрия (1:10000)) или «смывы» из грудной полости. Можно использовать плазму крови животных (из сердца или периферических сосудов). Исходное разведение плазмы приравнивается к разведению сыворотки 1:5.

При исследовании грызунов, добытых орудиями лова или павших, после взятия материала для бактериологического исследования в грудной полости грызунов готовят суспензию из сгустков крови сердца («смыв» 1:10). «Смывы» исследуют в РНГА и методом ПЦР.

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



Домашние животные относятся к малочувствительным видам (3 группа). При их исследовании используют серологические методы, реже – внутрикожную пробу с тулярином. Посевы из органов или биопробу применяют при обследовании павших, забитых, больных животных.

Целесообразно исследовать сыворотки домашних животных в РА и РНГА, считая диагностически значимыми титры в РА - 1:40 и выше и в РНГА - 1:160 и выше.



Исследование насекомых и других беспозвоночных

Клещей (50 особей), промывают в 10 мл спирта, 3-4 раза в ДВ, растирают в ступке с 5 мл стерильного 0,9% NaCl, перемешивают в суспензию, и вводят биопробному животному.

Личинок, блох, вшей объединяют по 100-200 экз., нимф - по 50-100, растирают, добавляют 1-3 мл 0,9 % NaCl, полученную суспензию вводят биопробному животному.

Кровососущих двукрылых усыпляют парами эфира. У слепней отстригают ноги и крылья. В один анализ объединяют 25-50 слепней или 100 комаров, или 250 мошек, растирают в ступке, добавляют 5 мл 0,9 % NaCl, вводят биопробному животному.

Гидробионтов промывают в воде и 1-2 порциях ДВ, объединяют в группы по 5-10-50 экз., растирают, добавляют 2-5 мл 0,9 % NaCl, и вводят биопробному животному.



Исследование объектов внешней среды

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

В зимнее время пробы берут в прорубях, при глубоком промерзании со дна берут лед или ил. Для концентрирования возбудителя используют фильтрование, центрифугирование.

Белым мышам вводят п/к до 1 мл, а морским свинкам до 5 мл воды.

С гнездового материала делают смыв 0,9% NaCl. Для этого 5-10 г исследуемого субстрата помещают в стерильный сосуд, заливают двойным по весу количеством раствора и встряхивают.

Смыв набирают в шприц и вводят биопробному животному.



Исследование погадок птиц и помета хищных млекопитающих

Гибель туляремийного микроба в погадках и помете происходит быстро (в первые сутки; при отрицательных температурах, возможно, медленнее), в связи с чем биологическое и бактериологические исследования этого материала нецелесообразны. Пробы погадок и помета используют для поиска антигена возбудителя туляремии иммуносерологическими методами и ДНК методом ПЦР.

Объекты подлежащие исследованию на туляремию

от больных людей:

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

от умерших людей:

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

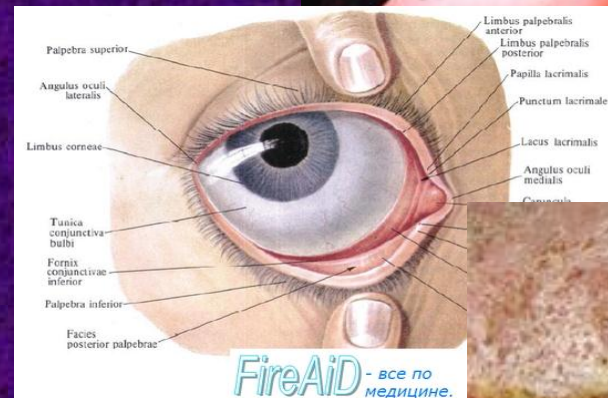


Схема 6.3. ЛАБОРАТОРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА НА ТУЛЯРЕМИЮ



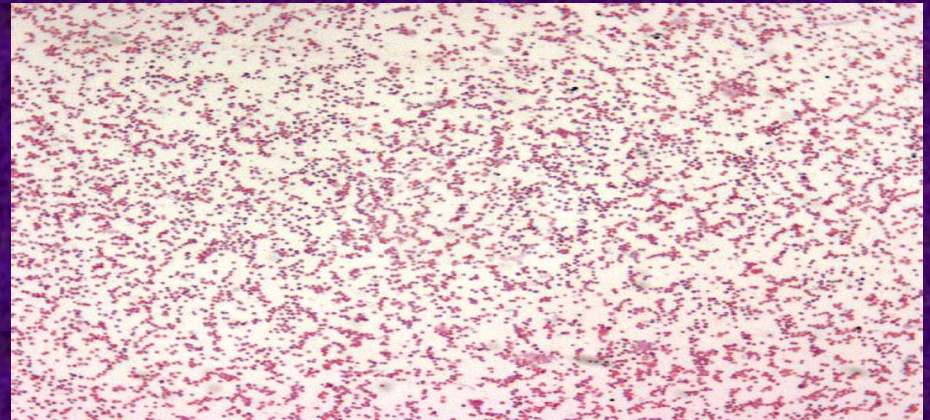
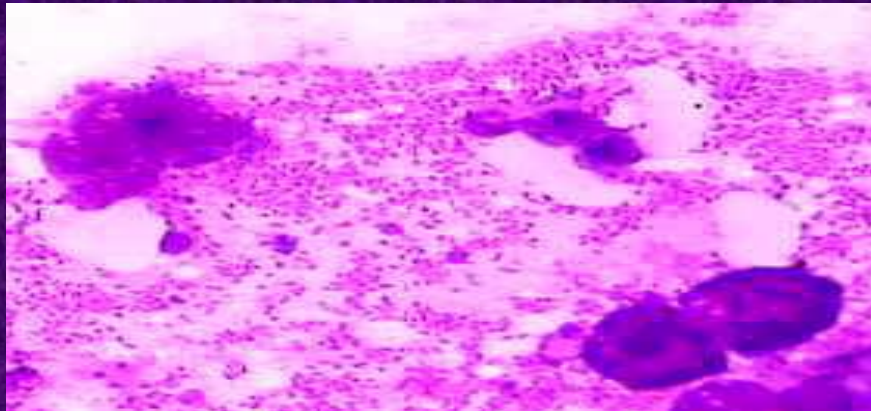
Методы лабораторной диагностики

Бактериоскопия

Ввиду очень мелких размеров туляремийный микроб может быть обнаружен в мазках-отпечатках из обильно обсемененного патологического материала. Метод не используется при исследовании воды, смывов с объектов внешней среды.

В правильно окрашенном мазке по Романовскому-Гимзе бактерии туляремии имеют сиреневый цвет.

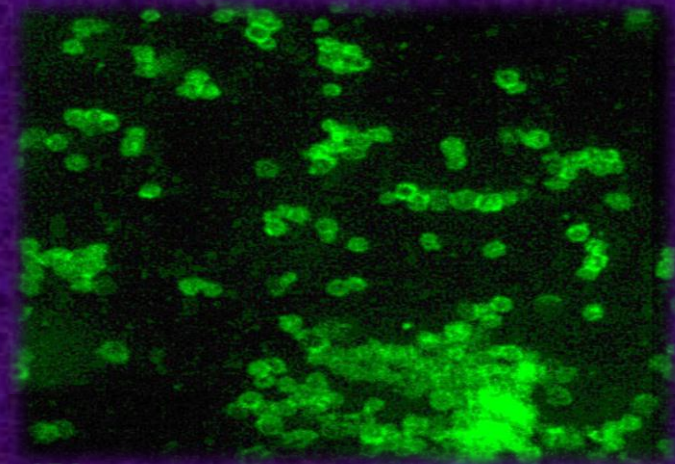
При идентификации возбудителя туляремии может быть применена окраска бактерий по Граму. При этом клетки *F. tularensis* окрашиваются в слабо-розовый цвет.



Люминесцентная микроскопия (МФА) выявляет как живые, так и мертвые бактерии при концентрации 1 млн. м.к. в 1 мл.

Используют иммуноглобулины диагностические туляремиальные флуоресцирующие производства:

- «Медгамал» НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи
- ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора



Бактериологический метод

Посев применяют для выделения культуры из органов павших или забитых диких и лабораторных животных, а также зверьков, у которых обнаружены патологоанатомические изменения. Посевы следует выдерживать в термостате при температуре 37 °С не менее 10 суток.

Скорость появления роста культуры зависит от количества микробов в исследуемом материале.

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

Бактериологические методы диагностики туляремии у людей имеют дополнительное значение и не всегда эффективны.

Лишь в редких случаях удастся выделить возбудитель туляремии из патологического материала от больных людей (содержимое язвы на коже, содержимое бубона и т.д.).

Патологический материал от больных может быть исследован методом посева лишь в первые 2-3 недели от начала болезни. Скорость появления роста культуры зависит от количества микробов в исследуемом материале: при посеве слабо инфицированного материала рост отдельных колоний возможен в отдаленные сроки, поэтому посеvy следует выдерживать в термостате при температуре 37 °C в течение не менее 10 сут.

Биологический метод

Для биопробы используют высокочувствительных лабораторных животных – б/м, м/с. (можно грызунов 1 группы чувствительности).

Заражение этих животных материалом, содержащим даже 1 м.к. возбудителя, приводит к развитию инфекционного процесса и накоплению микробов.

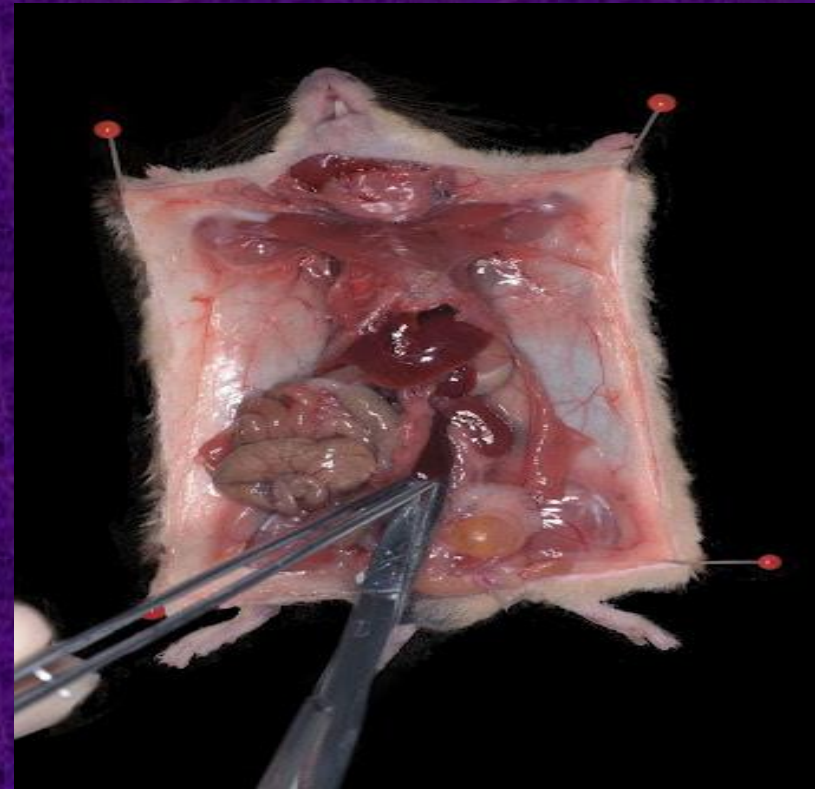
Животных заражают подкожно б/м - 0,5 мл, м/с - 1-2 мл.

Биопробных животных выдерживают: б/м до 21 суток, м/с - до 25 суток.



Патоморфологические изменения:

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



Из материала от биопробных животных делают:

- мазки-отпечатки (окраска по Романовскому-Гимзе и РИФ.
- посевы органов на питательные среды.
- готовят суспензию для иммунологического исследования

Подготовка исследуемого материала к серологическому исследованию

Культуры - готовят взвеси ($1,0 \times 10^9$ м.к./мл), прогревают при t (100 ± 1) °С - 20 мин, с добавлением формалина до 2 % и оставляют на 2 ч. при t (22 ± 4) °С. 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 % формалина, отбирают жидкую часть и кипятят при t (100 ± 1) °С 20 мин., выдерживают 2 ч. при t (22 ± 4) °С, фильтруют.

Погадки заливают 1 % формалином, до избытка в 5-10 мл, и разминают. Отстаивания (1-6 ч.), надосадочную жидкость отбирают, прогревают при t (100 ± 1) °С 20 мин., фильтруют.

Субстрат гнезд заливают 1 % формалином с избытком в 10-11 мл, через 1-2 ч. отбирают надосадочную жидкость, прогревают при t (100 ± 1) °С 20 мин. и фильтруют.

Объектов водной среды отбирают 0,5 л, прогревают при t (100 ± 1) °С 20 мин., инактивируют формалином до конечной концентрации 2 % (на 500 мл пробы – 10 мл формалина) и оставляют на 2 ч. при t (22 ± 4) °С.

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

Иммуноферментный анализ (ИФА)

С помощью ИФА возможно обнаружение 10^3 - 10^4 туляремийных бактерий в 1 мл.

Используют Тест-систему иммуноферментную для выявления возбудителя туляремии в иммуноферментном анализе (Ставропольский НИПЧИ).



Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА)

Чувствительность - 10^5 – 10^6 м.к./мл.

Используют эритроцитарный иммуноглобулиновый (Ставропольский НИПЧИ) диагностикум туляремиальный сухой

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) - характеризуется высокой специфичностью и информативностью. Для РНАт используют диагностикум эритроцитарный антигенный туляремийный (Ставропольский НИПЧИ).

Реакция **объемной агломерации (РОА)**. Метод РОА выявляет не менее 8×10^5 м.к./мл возбудителя туляремии. В Ростовском противочумном институте разработан способ получения основы диагностикумов для РОА.

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

Наиболее эффективными и доступными методами выявления антител являются:

- реакция агглютинации (РА)
- реакция непрямой гемагглютинации (РНГА).

РА служит для установления диагноза у больного и при изучении иммунологического статуса 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 против туляремии агглютинины через 4-6 недель - 1:160 - 1:320, затем снижаются до 1:10 - 1:40 и обычно выявляются в течение 5-7 лет.

Используют туляремийный диагностикум (убитая формалином взвесь туляремийных бактерий вакцинного штамма (1 мл - 25 млрд. м.к.).

Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) – чувствительный метод для ранней и ретроспективной диагностики, для определения иммунного статуса привитых.

Диагностический титр при исследовании первичных сывороток - 1:200 и более. Обязательно подтверждение нарастания титра (в 2-4 раз).

У больных антитела обнаруживаются в конце 1 недели заболевания, через 1-1,5 мес. достигают - 1:10000-1:20000, после чего снижаются до 1:100-1:200 и сохраняются длительное время.

У привитых антитела обнаруживаются в титрах 1:2000-1:5000 через 1-1,5 мес., сохраняются в течение нескольких лет на уровне 1:20-1:80.

Антигены - формализированные эритроциты барана, сенсibilизированные туляремийным антигеном.

Жидкий препарат – 10 % взвесь эритроцитов в растворе формалина 10 % концентрации.

Лиофилизированный препарат - высушенная в вакууме 10 % взвесь эритроцитов без консерванта.

РНАг применяется для подтверждения РНГА. РНАг выявляет как полные, так и неполные антитела.

АЛЛЕРГОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА

У больных кожная аллергическая реакция становится положительной с 3-5 суток болезни. Аллергический ответ у вакцинированных сохраняется 5-6 лет.

Для внутрикожной пробы применяют внутрикожный тулярин - взвесь туляремийных бактерий вакцинного штамма, убитых нагреванием при температуре 70 °С в течение 1 ч.

В 1 мл препарата содержится 500 млн. убитых бактерий (или 10 человеко-доз).

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

Учет и оценка реакции через 24-48 ч.

При положительной реакции через 6-10 ч. обнаруживаются гиперемия и инфильтрат диаметром не менее 0,5 см.

Изменения кожи в виде гиперемии без инфильтрата, исчезающие через 48 ч., не учитываются.

Для накожной пробы применяют накожный тулярин - взвесь туляремийных бактерий вакцинного штамма, убитых нагреванием при температуре 70 °С в течение 1 ч.

В 1 мл препарата содержится 10 млрд. убитых бактерий (20 человеко-доз). Препарат предназначен для определения иммунитета у привитых или для ретроспективного обслед-я.

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

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

Идентификация выделенной культуры:

- 1) морфология и окраска бактерий в мазках и специфическое свечение в МФА;
- 2) характер роста на питательных средах (на свернутой желточной среде Мак-Коя);
- 3) отсутствие роста на простых питательных средах типа мясопептонного агара или бульона;
- 4) агглютинация специфической туляремийной сывороткой (производство Иркутского НИПЧИ Сибири и Дальнего Востока);
- 5) вирулентность для белых мышей и морских свинок;
- 6) выявление в ПЦР видоспецифичных ДНК-мишеней.

ВНУТРИВИДОВОЕ ТИПИРОВАНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУЛЯРЕМИИ

- ферментация глицерина,
- цитруллинуреидазная активность,
- фосфатазная активность,
- пенициллиназная активность,
- вирулентность для кроликов,
- выявление подвидспецифичных генетических маркеров с помощью ПЦР

➤ ферментация глицерина

Производят посев полной стандартной петли культуры, посева инкубируют при температуре 37 °С в течение 48 ч.

- **голарктические штаммы** - неферментирующие глицерин не изменяют окраску среды (красная) (-)
- **неарктические и среднеазиатские** – глицерин-позитивные окрашивают среду в желтый цвет (+)

➤ цитруллинуреидазная активность

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

- фосфатазная активность
 - **голарктические штаммы** - окраску реакционной смеси не изменяют (-).
 - **неарктические и среднеазиатские штаммы**, обладающие фосфатазной активностью, окрашивают раствор в ярко-малиновый цвет (+).
- пенициллиназная активность
 - **голарктические и неарктические** культуры - в желтый (-).
 - **среднеазиатские штаммы** окрашивают пробы в темно-красный цвет (+).
- вирулентность для кроликов,
 - 1 м.к. **неарктического** штамма вызывает гибель животных
 - культуры **голарктического или среднеазиатского** подвидов даже в дозе 1×10^6 м.к. не обеспечивают гибель животных
- выявление подвидспецифичных генетических маркеров с помощью ПЦР.

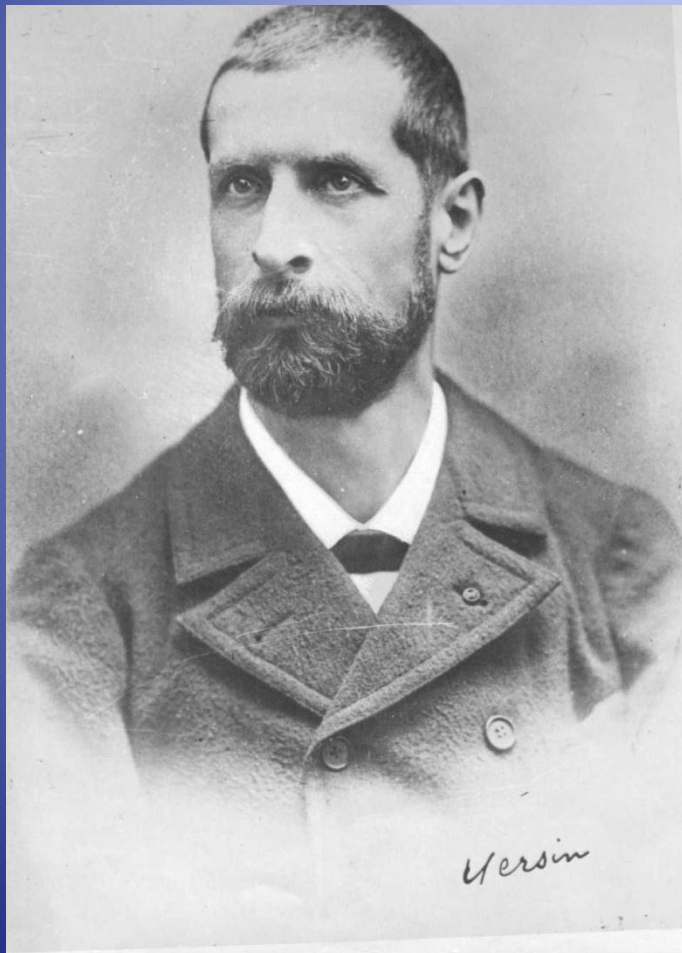
В основе метода лежит амплификация специфичных для каждого подвида фрагментов области дифференциации генома *F. tularensis* RD1.

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	+	-	+	+

1	2	3	4	5
Продукция индофенолоксидазы	-	-	-	-
Протеолитическая активность	-	-	-	-
Фосфатазная активность	+	-	+	+
Агглютинабельность с противотул. сывороткой	+	+	+	+(-)
Моль % G+C ДНК	33-36	33-36	33-36	34
% гомологии по гену 16 S рРНК с <i>F. tularensis</i> ATCC 6223	≥99,8	≥99,8	≥99,8	≥99,8
Наличие гена <i>lpr</i> , кодирующего синтез белка моле-кулярной массой 17 кДа	+	+	+	+
LD ₅₀ для кроликов, м.к.	< 10 ¹	> 10 ⁶	> 10 ⁶	> 10 ⁶
Минимальная заражающая доза для мышей, м.к.	1-10	1-10	1-10	> 10 ³
Ареал распространения	Только на территории Северной Америки	Северного полушария, за исключе-нием Англии, Исландии и Португалии	Район поймы рек Чу и Или (Казахстан) и дельты реки Амударья (Узбекистан)	Только на территории Северной Америки

Лабораторная диагностика Чумы

Александр Иерсен
(Alexander Yersin)
1863-1943 гг.



1894 г.

Гон Конг

Открытие возбудителя
чумы - *Yersinia pestis*

Сибасабуру Китозато (1856 - 1931)

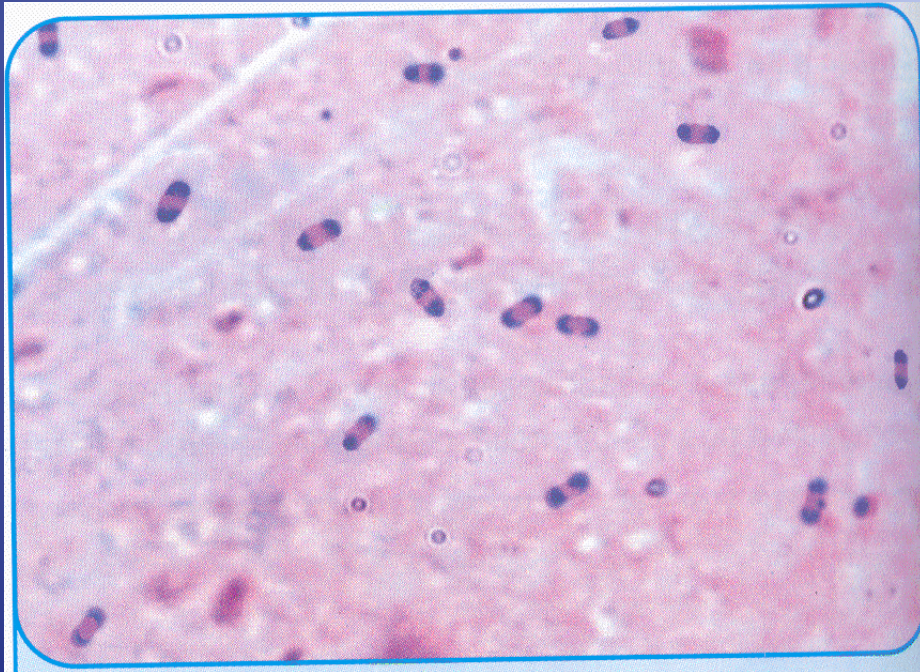


1894 г.

Гон Конг

Открытие возбудителя
чумы - *Yersinia pestis*

Морфология и тинкториальные свойства



- Грам-отрицательная
- палочка овоидной формы (0,5-0,8x1-3 мкм)
- биполярная
- неподвижная
- спор не образует
- капсула при 37С

Культуральные свойства

- Психрофил – 28С (2-40С)
- Тип дыхания – факультативный анаэроб
- Тип питания – хемогетеротроф

Природный ауксотроф:

основные - met phe thr cys

дополнительные – arg leu thi (по очагам)

Ферментативная активность

- Ферментирует: глюкозу, галактозу и т.д.
- Не ферментирует: лактозу, сахарозу
- Глицерин: «+/-»
- Рамноза: «+/-»
- Уреаза отсутствует
- Желатину не разжижает
- Белки не гидролизует

Условия культивирования и требования к питательным средам

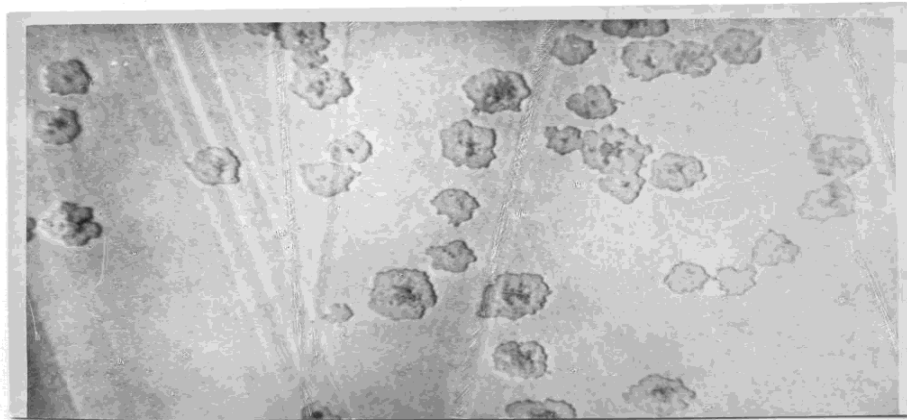
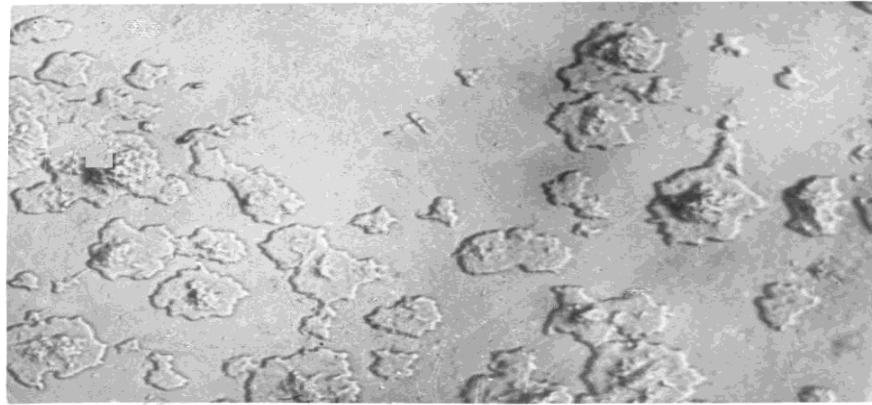
- Питательные среды должны содержать продукты глубокого гидролиза белков – аминокислоты, пептиды
- Стимуляторы роста:
 - 1-5% гемолизированная кровь
 - 0,025% р-р сульфита Na
- Оптимальная t культивирования – 26-28С
- pH среды – 7,0-7,2
- Ингибиторы роста посторонней микрофлоры:
 - генцианвиолет (1:100-1:800 тыс.),
 - фосфомицин (50 мкг/мл)

Рост на питательных средах



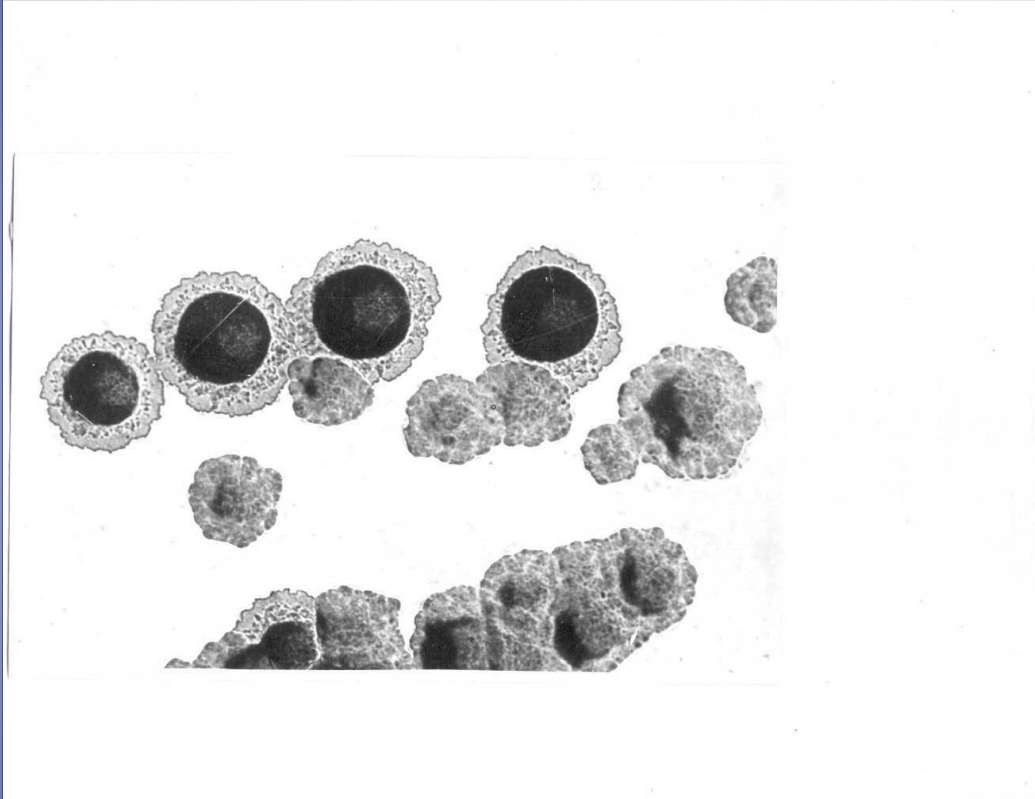
- **R форма. Фазы роста на твердых ПС:**
а) латентная – 3-8 ч «нити» б) логарифмическая – 16-24 ч «битое стекло»

Рост на питательных средах



- R форма. Фазы роста на твердых ПС:
в) 24-36 ч «кружевные платочки»

Рост на питательных средах

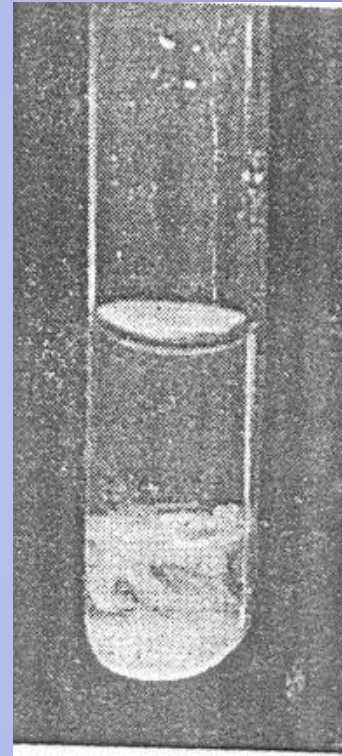


- **R форма. Фазы роста на твердых ПС:**
в) стационарная – до 48 ч макроколонии

Рост на питательных средах



R форма, агар



R форма, бульон
(прозрачный б-н,
пристеночный рост)

Диагностические бактериофаги

- Д`Эррель (1920) – чумной бактериофаг
- М.П. Покровская (1929) – чумной фаг
Покровской
- В.С. Ларина (1970) – фаг Л413 «С» (чумной)
- Д`Эррель (1920) – фаг псевдотуберкулезный

Диагностическое значение

На всех этапах бактериологического анализа специфичность выделяемой культуры *Y. pestis* должна быть подтверждена положительной пробой с чумным бактериофагом

Коммерческие бактериофаги:

- чумной фаг Покровской – высокоспецифичен для *Y. pestis*, но лизирует до 25% штаммов *Y. pseudotuberculosis*, что требует определения ДРТФ
- чумной фаг Л413 «С» - видоспецифичен

Широкое распространение явления
бактериофагии у *Y. pestis*
обуславливает необходимость
применения антифаговой сыворотки
при выделении чистых культур

Видоспецифичные антигены

- Капсульный антиген – фракция I (FraI)
- Мышиный токсин - Tox (Ymt)
- Активатор плазминогена – Pla
- Пестицин - Pst

Нормативно-методические документы

- Приказ №88 от 17.03.2008 г. «О мерах по совершенствованию мониторинга за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней»
- МУ 3.1.3.2355-08, утв. 15.01.2002 г. «Методические указания по организации и проведению эпидемиологического надзора в природных очагах чумы на территории Российской Федерации»
- Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.7.1380-03 "Профилактика чумы" (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 6 июня 2003 г.)
- Практическое руководство «Лабораторная диагностика особо опасных инфекций», утв. (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 12 декабря 2007 г.)

Методы исследования

- Бактериологический
- Биологический
- Иммунологический
- Молекулярно-генетический

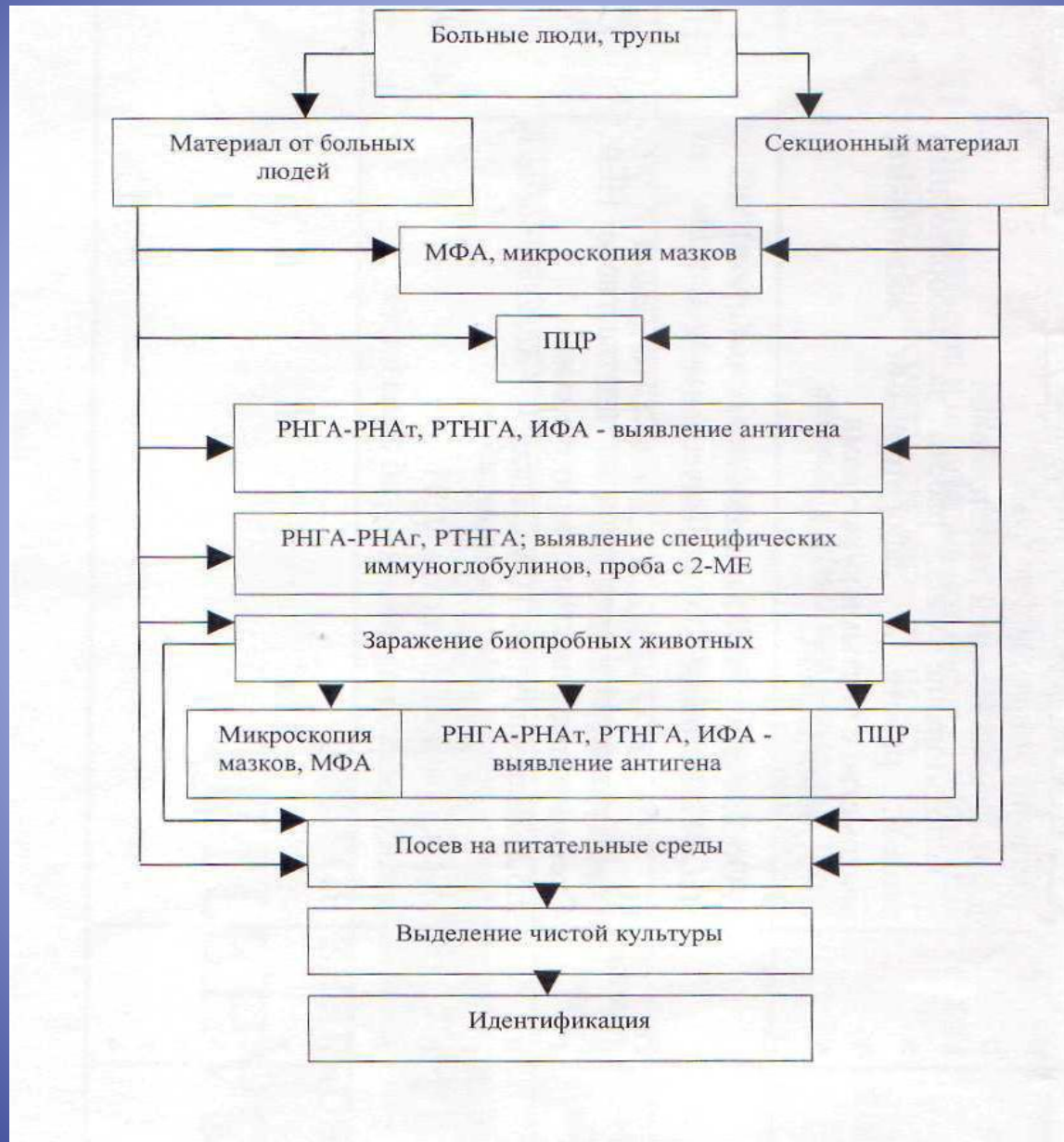
Методы специфической индикации

- МФА
- ИФА (в т.ч. ДИА)
- ПЦР

Дополнительные методы

- Гемагглютинационные тесты (РНГА, РТНГА, РНАт, РНАг)
- Реакция гемагломерации

Схема лабораторной диагностики чумы



Материал от больных, свободный от банальной микрофлоры

1-2 часа

«подозрение на чуму,
исследование
продолжается»

- Бактериоскопия, МФА
- ПЦР
- Иммунологические реакции
- Посев на питательные среды
- Постановка биопроб

3-6 часов

Подтверждение
предварительного
положительного ответа

- Учет результатов иммунологических реакций

18-24 часа

Выделение культуры
чумного микроба,
исследование
продолжается

- Просмотр посевов, бактериоскопия колоний
- Отсев колоний на сектора
- Определение чувствительности к б/ф и а/б
- Проба на антигенурию

Материал от больных, свободный от банальной микрофлоры

36-48 часов

«выделяющаяся культура чувствительна к чумному б/ф»

- Учет проб с б/ф

48-72 часа

«выделяющаяся культура чувствительна к а/б (перечисление)»

- Учет чувствительности к а/б

72 часа

Подтверждение предварительного положительного ответа, данного через 18-24 часа

- Вскрытие б/п, зараженных вн/б нативным материалом (описание п/а картины, просмотр мазков и мазков-отпечатков, посев органов и крови)

Материал от больных, свободный от банальной микрофлоры

96 часов

Окончательное заключение об отнесении выделенной культуры к виду *Y.pestis*

- Просмотр посевов от б/п
- ИФА, РНГА, РНАт с суспензиями органов

Сокращенная схема идентификации возбудителя чумы

- морфология и отношение к окраске по Граму в мазках из нативного материала
- рост на средах
- чувствительность к чумным диагностическим б/ф Л-413С, Покровской и псевдотуберкулезному
- отсутствие ферментации мочевины
- наличие Ф1
- детекция специфической ДНК - ПЦР (при наличии оборудования)
- чувствительность к а/б методом дисков

Дополнительные тесты для окончательной идентификации

- определение ферментативной активности к моно-, ди-, трисахарам, спиртам, глюкозидам
- нитрифицирующая и денитрифицирующая способность
- подвижность при 20-22⁰C
- пестицин-фибринолизин-коагулазная активность
- чувствительность в пестицину
- питательные потребности
- вирулентность для лабораторных животных
- пигментсорбция
- зависимость роста от ионов кальция при 37⁰C
- и др.

Особенности исследования материала от больных, обсемененного банальной микрофлорой

- посев, в т.ч. от б/п, на плотные питательные среды с сульфитом натрия (лизированной кровью) и генцианвиолетом
- заражение б/п: 2 м/св и 2-4 б/м (н/к; п/к)
- вскрытие б/п несколько позже – через 72-96 часов – 120-168 часов

Материал от трупов людей с заметными явлениями разложения

1-2 часа

«подозрение на чуму,
исследование
продолжается»

- Бактериоскопия, ИФА
- Посев на агар с гвс (лк), дублировать посеваы
- Посев костного мозга на отдельную чашку
- ПЦР
- ИФА, РНГА, РНАт – обнаружение Ф1
- Постановка биопроб 2м/св, 2-4 б/м, дополнительно 2 б/м для посева костного и головного мозга

3-6 часов

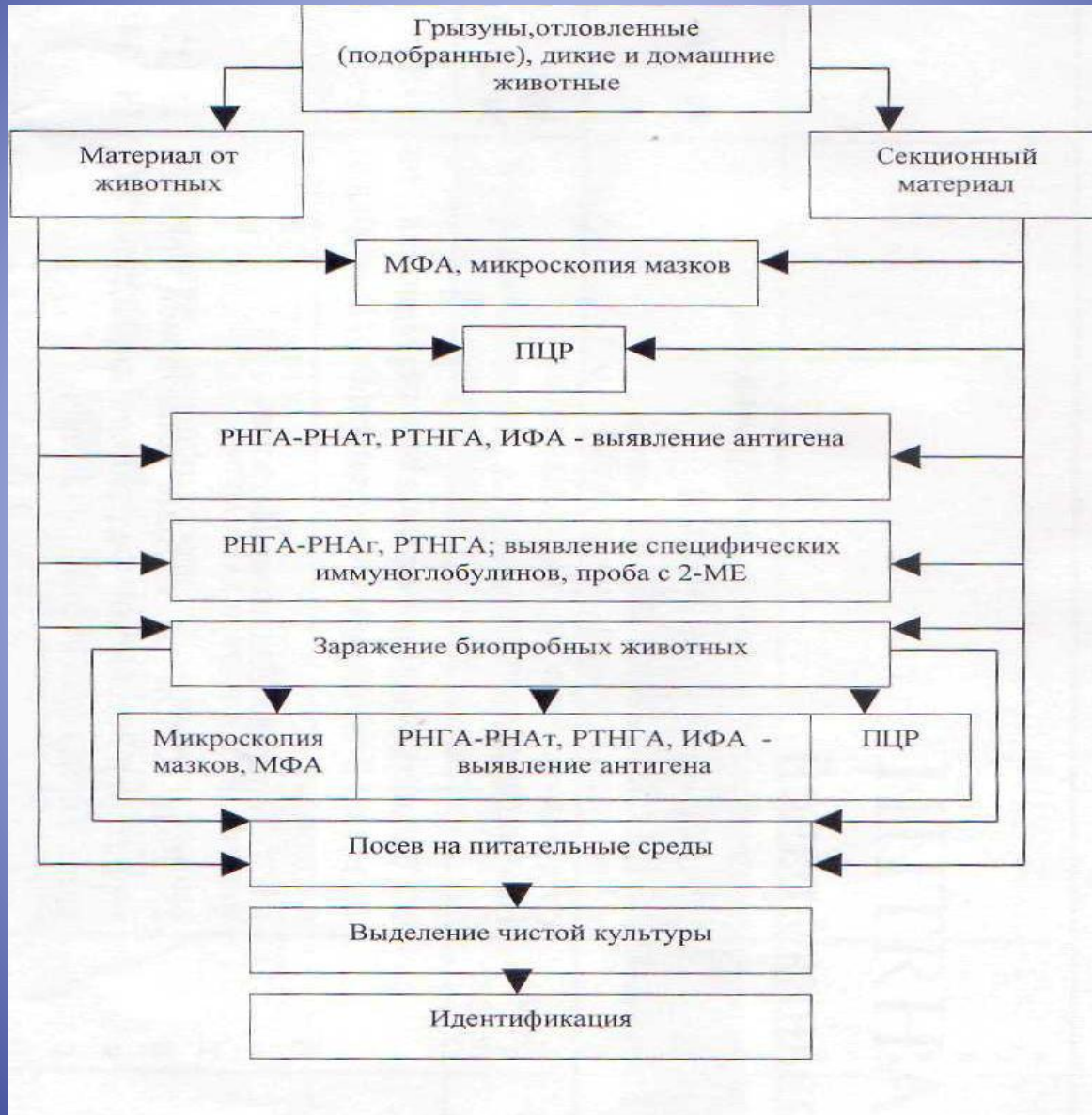
Положительные
результаты реакций
дают право на
ориентировочный

положительного ответа

- Учет результатов ПЦР, ИФА, РНГА, РНАт

Далее как схема анализа
материала,
обсемененного
банальной микрофлорой

Схема лабораторной диагностики чумы



Особенности анализа материала от трупов отловленных и умерщвленных грызунов с явно выраженным комплексом п/а изменений, характерных для чумы

- исследуют индивидуально
- посев паренхиматозных органов, л/узлов, костного мозга на агар с сульфитом натрия (лизированной кровью)
- посев крови из сердца в бульон
- заражение б/проб: б/м или дикие грызуны того же вида (после 30-дневного карантина)
- определение Ф1 в РНГА, РНАт или ИФА

Далее исследуют по схеме анализа свежего трупа без признаков разложения, лежавшего менее 5-6 часов.

Особенности анализа материала от трупов отловленных и умерщвленных грызунов без патологоанатомических изменений, характерных для чумы

Исследуют в соответствии с конкретной обстановкой и поставленной перед обследованием задачей:

- Индивидуальные посева печени, селезенки, сердца на сектора на селективные среды
- Постановка групповой биопробы на б/м или диких грызунах того же вида (после 30-дневного карантина) н/к или п/к
- При соответствующих показаниях все среды обрабатывают антифаговой сывороткой

Далее исследуют по схеме анализа свежего трупа без признаков разложения, лежавшего менее 5-6 часов.

Особенности анализа материала от трупов грызунов, подобранных в поле

- Исследуют индивидуально по схеме трупа человека, пролежавшего при комнатной температуре более 5-6 часов, и трупа человека с явными признаками разложения:

- бактериоскопия
- посев органов, крови из сердца на агар с сульфитом натрия (лизированной кровью) и гв (лучше в двух концентрациях)/ фосфамицином
- посев костного и головного мозга на отдельные агаровые пластины с 2-мя концентрациями гв и со стимулятором роста
- постановка биопроб: б/м (п/к и н/к, или только н/к, в зависимости от степени свежести трупа). При разложении трупа б/п из к/м и г/м ставят на отдельных б/м
- РНГА с эритроцитарным антительным диагностикумом
- РНАт с антигенным диагностикумом

Далее исследуют как труп человека с явными признаками разложения.

Схема лабораторной диагностики чумы

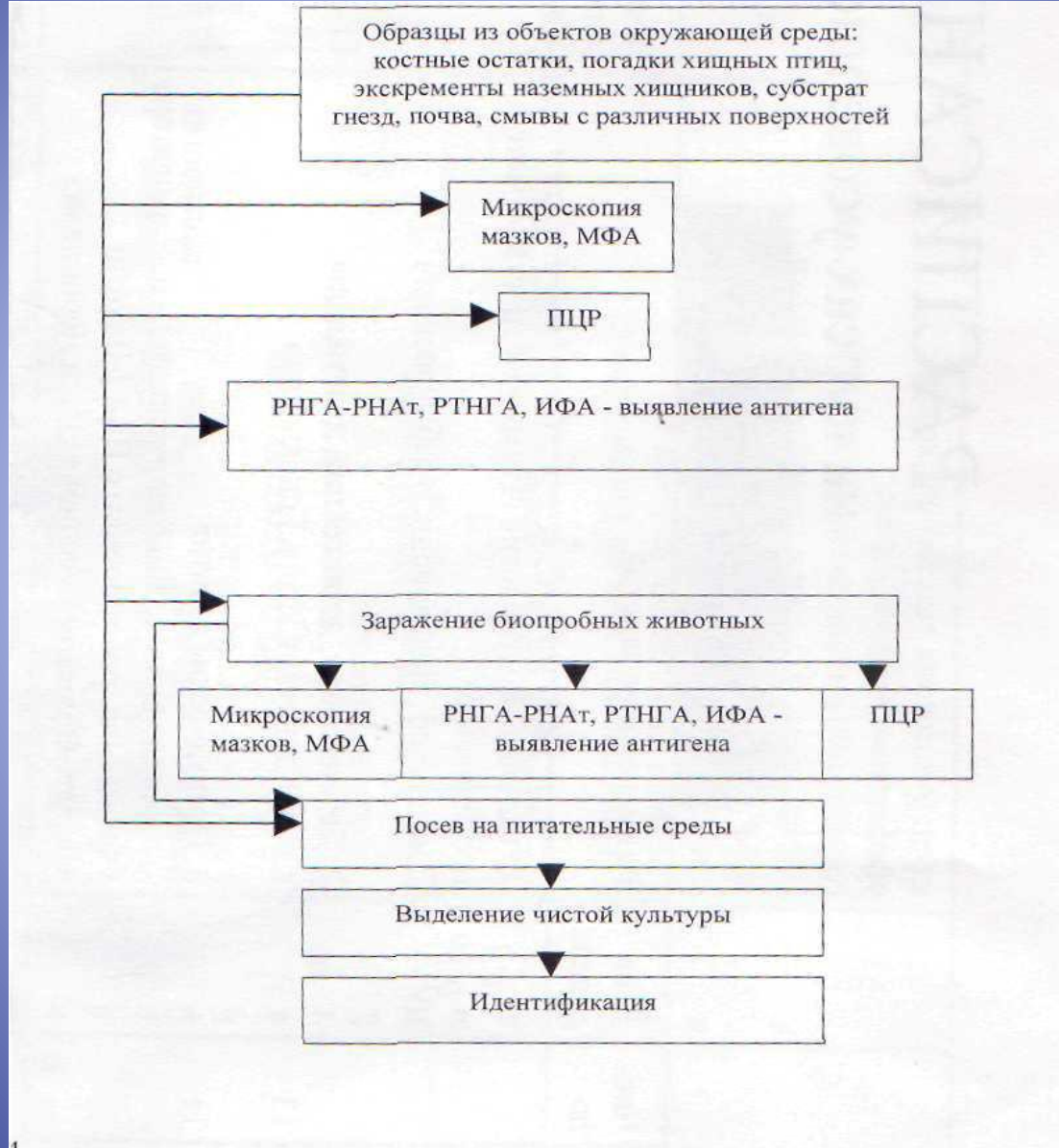
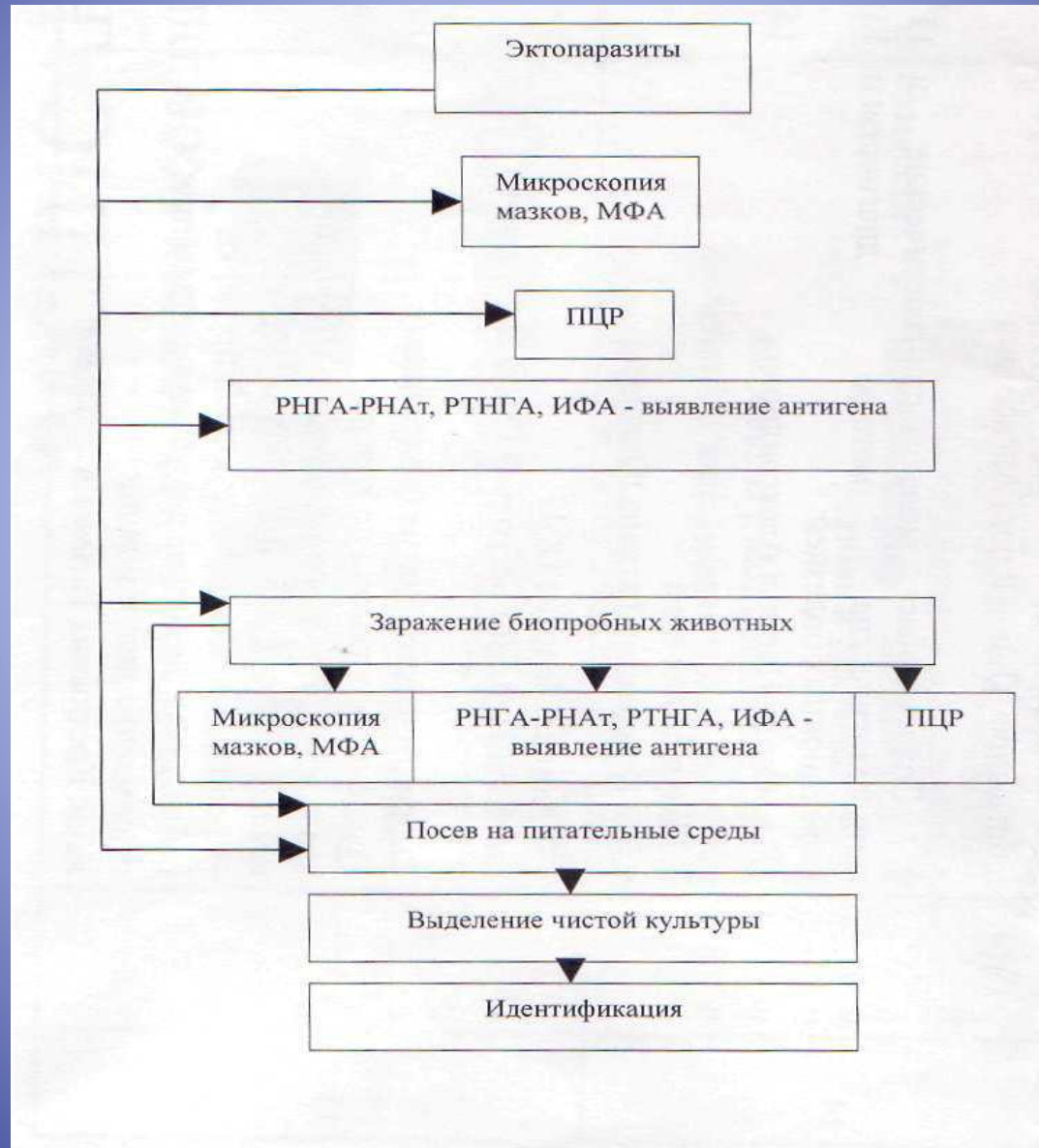


Схема лабораторной диагностики чумы



Особенности исследования эктопаразитов (блох, клещей)

- Обработка 70° спиртом
- Обработка 0,9% натрий хлор
- Приготовление суспензии в стерильной ступке с добавлением 0,5-1,0 мл питательного бульона или антифаговой сыворотки
- Посев на агар Хоттингера (Мартена) с сульфитом натрия (лк), гв или фосфомицином
- В отдельных случаях при конкретных задачах ставят биопробы на б/м подкожно.

Далее исследуют как материал, свободный от банальной микрофлоры

МИБП для диагностики чумы

Индикация

1. Иммуноглобулины
флуоресцирующие,
«Микроб») чумные
(РосНИПЧИ
2. ГенПест Тест-система для ПЦР метода,
(РосНИПЧИ «Микроб»)

МИБП для диагностики чумы

Экспресс-индикация и идентификация:

- 1 . Иммуноглобулины чумные адсорбированные для РА, РосНИПЧИ «Микроб»
- 2. Диагностикумы эритроцитарные чумные иммуноглобулиновый и антигенный, НИИМ МО (Киров)
- 3. Тест-система ИФА моноклональная для FI, НИИМ МО (Киров)
- 4. Бактериофаги чумные Л413 и Покровской, «РосНИПЧИ Микроб»

Определение культурально-морфологических и биохимических свойств

Питательные среды:

- для культивирования и выделения чумного микроба
- для идентификации по тесту подвижности и признаку ферментации углеводов и мочевины
- для определени потребности в ионах кальция, Иркутский НИПЧИ
- Кровь гемолизированная, «Микроб»