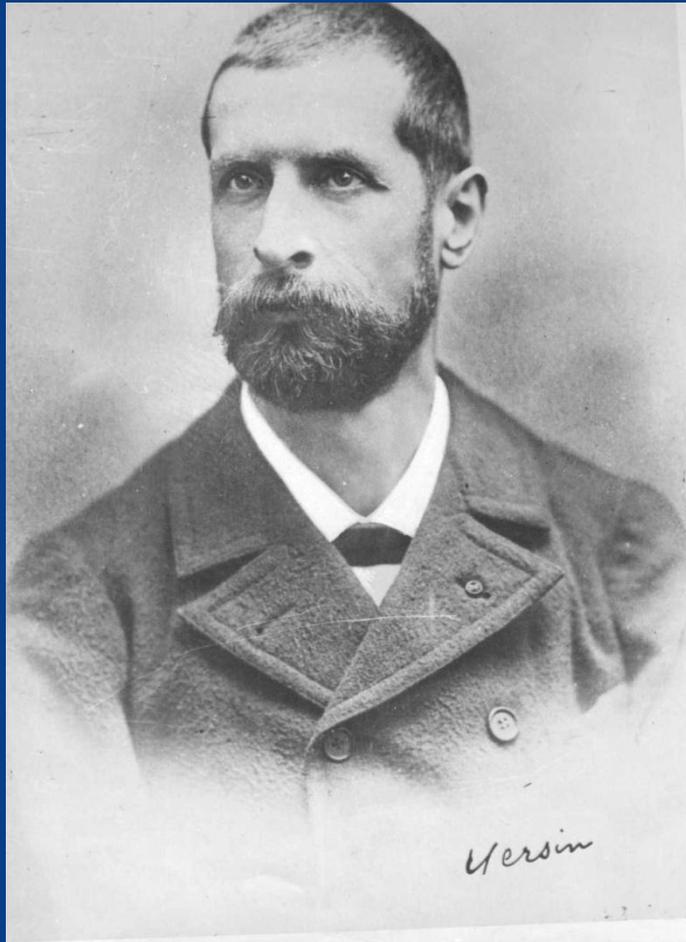


**Лабораторная диагностика  
особо опасных инфекций  
(чума, туляремия)**

# Лабораторная диагностика Чумы

**Александр Иерсен**  
**(Alexander Yersin)**  
1863-1943 гг.



1894 г.

Гон Конг

Открытие возбудителя  
чумы - *Yersinia pestis*

# Сибасабуру Китозато (1856 - 1931)

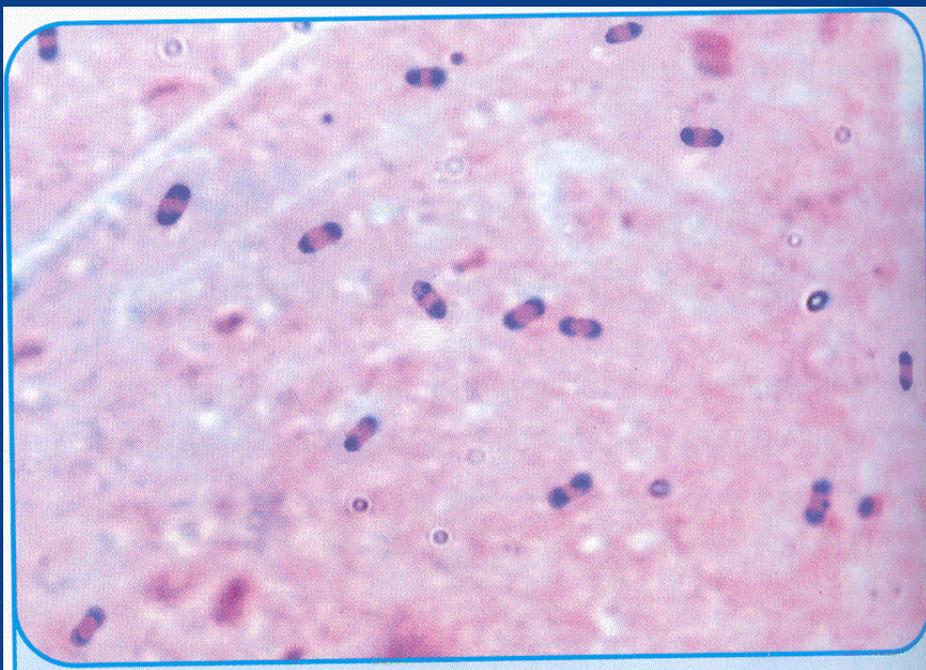


1894 г.

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 – **26-28C**
- pH среды – **7,0-7,2**
- Ингибиторы роста посторонней микрофлоры:
  - генцианвиолет (1:100-1:800 тыс.),
  - фосфомицин (50 мкг/мл)

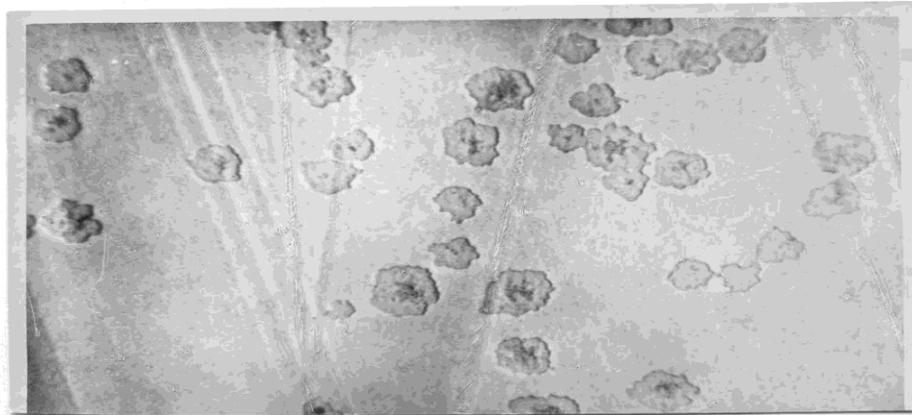
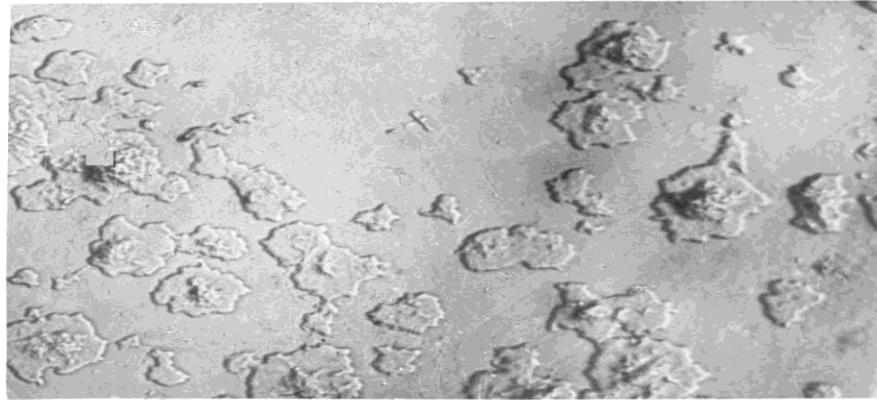
# Рост на питательных средах



- **R форма. Фазы роста на твердых ПС:**

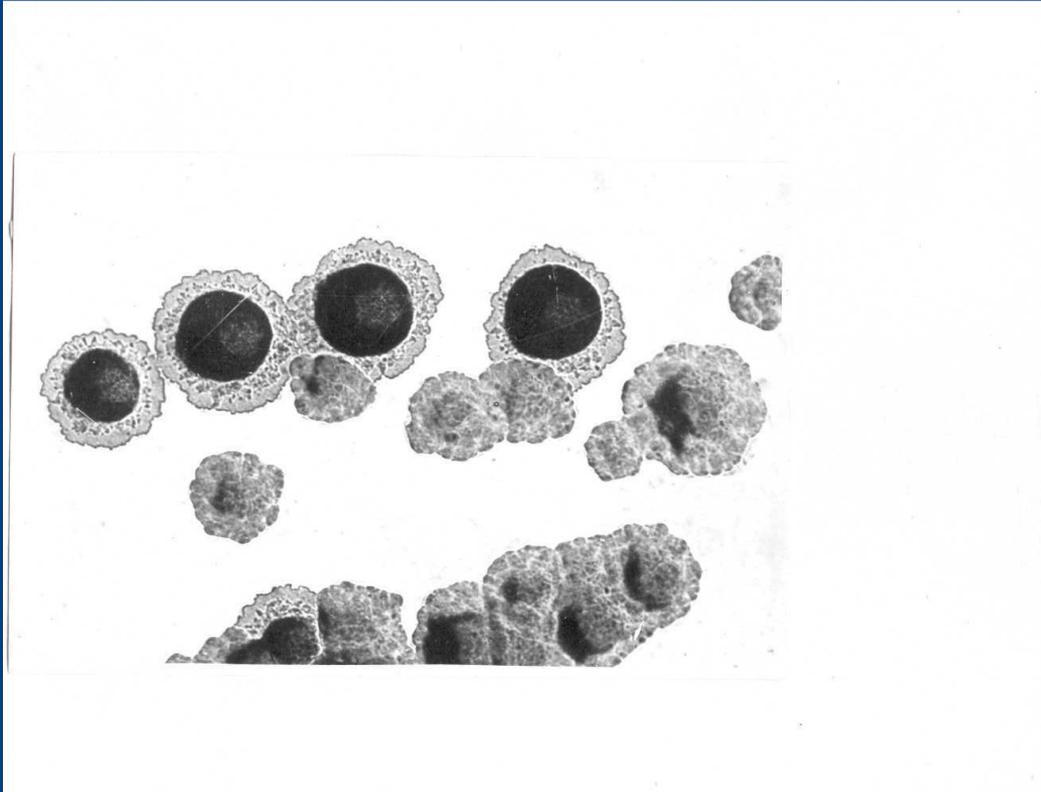
а) латентная – 3-8 ч «нити» б) логарифмическая – 16-24 ч «битое стекло»

# Рост на питательных средах



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

# Рост на питательных средах

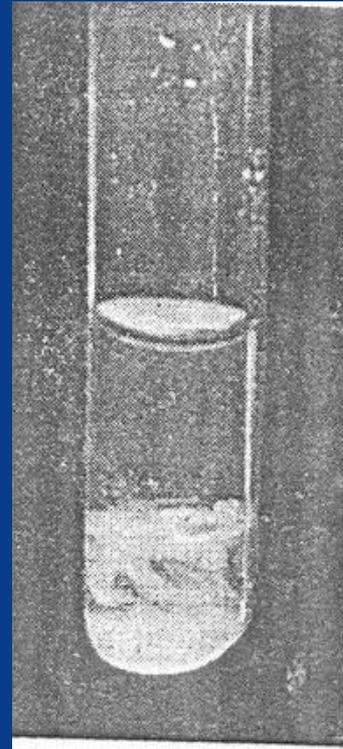


- **R форма. Фазы роста на твердых ПС:**  
в) стационарная – до 48 ч макроколонии

# 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

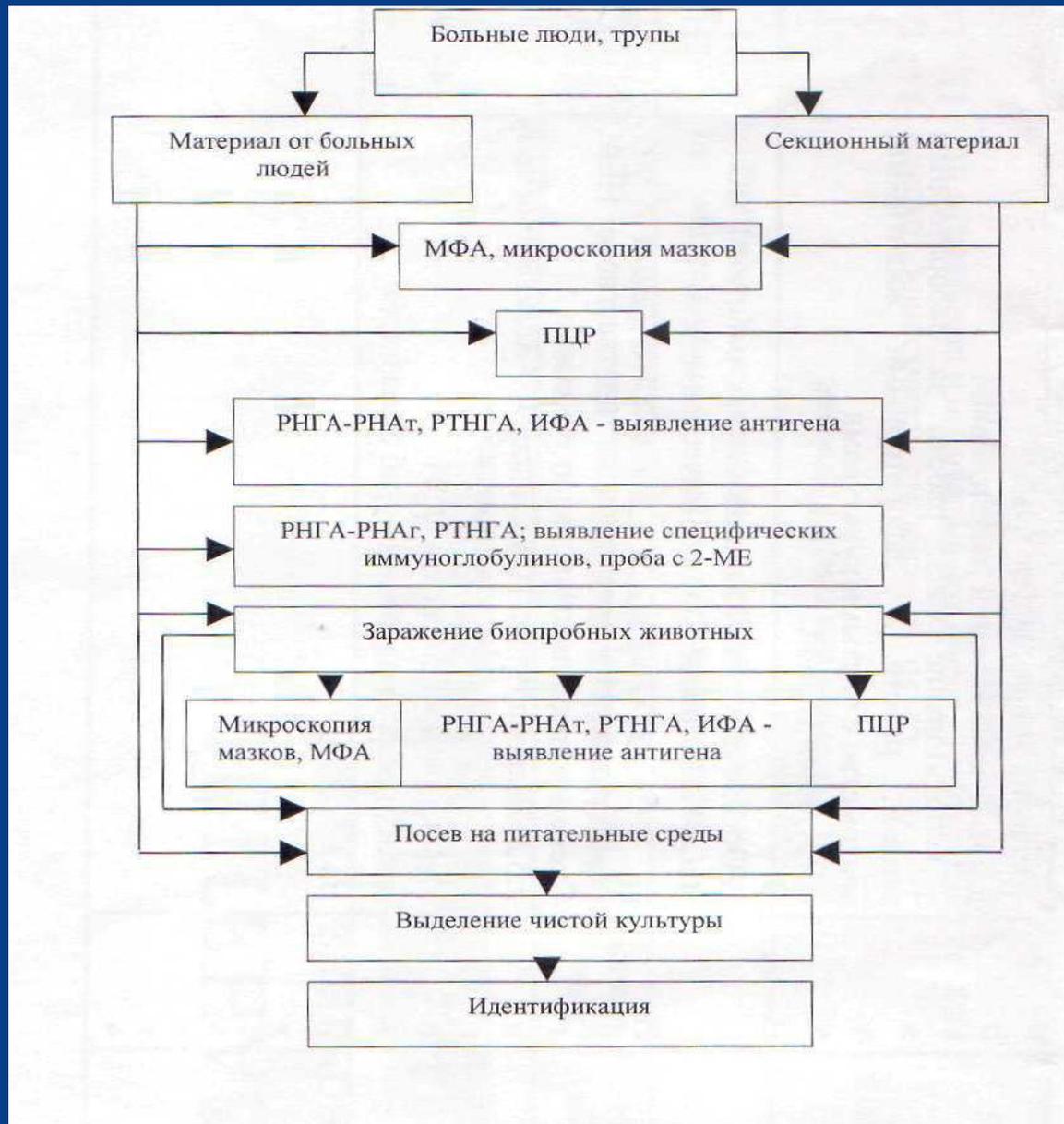
# Методы специфической индикации

- 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 20-22<sup>0</sup>С
- пестицин-фибринолизин-коагулазная активность
- чувствительность в пестицину
- питательные потребности
- вирулентность для лабораторных животных
- пигментсорбция
- зависимость роста от ионов кальция при 37<sup>0</sup>С
- 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

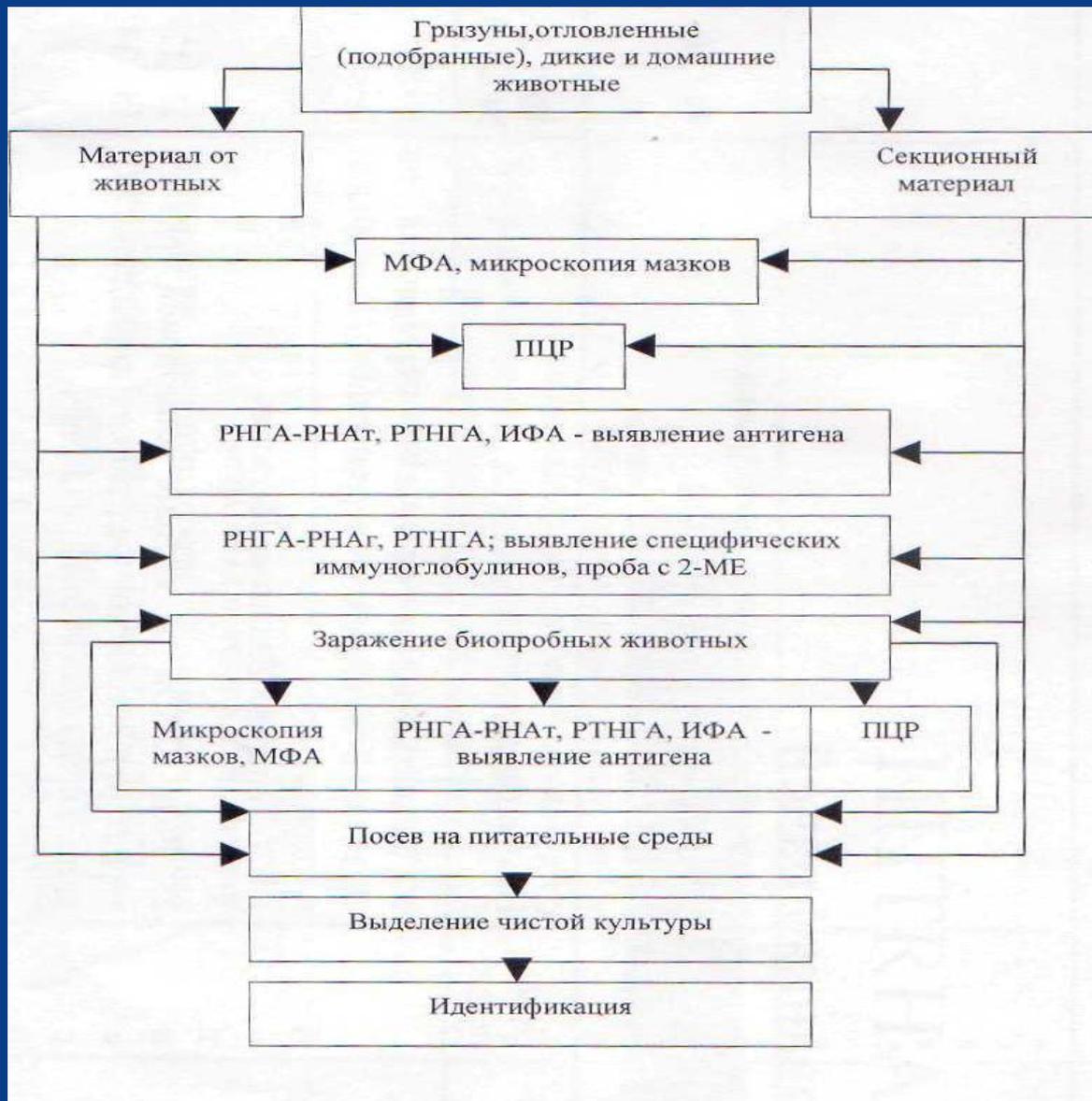
Положительные  
результаты реакций  
дают право на  
ориентировочный

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.

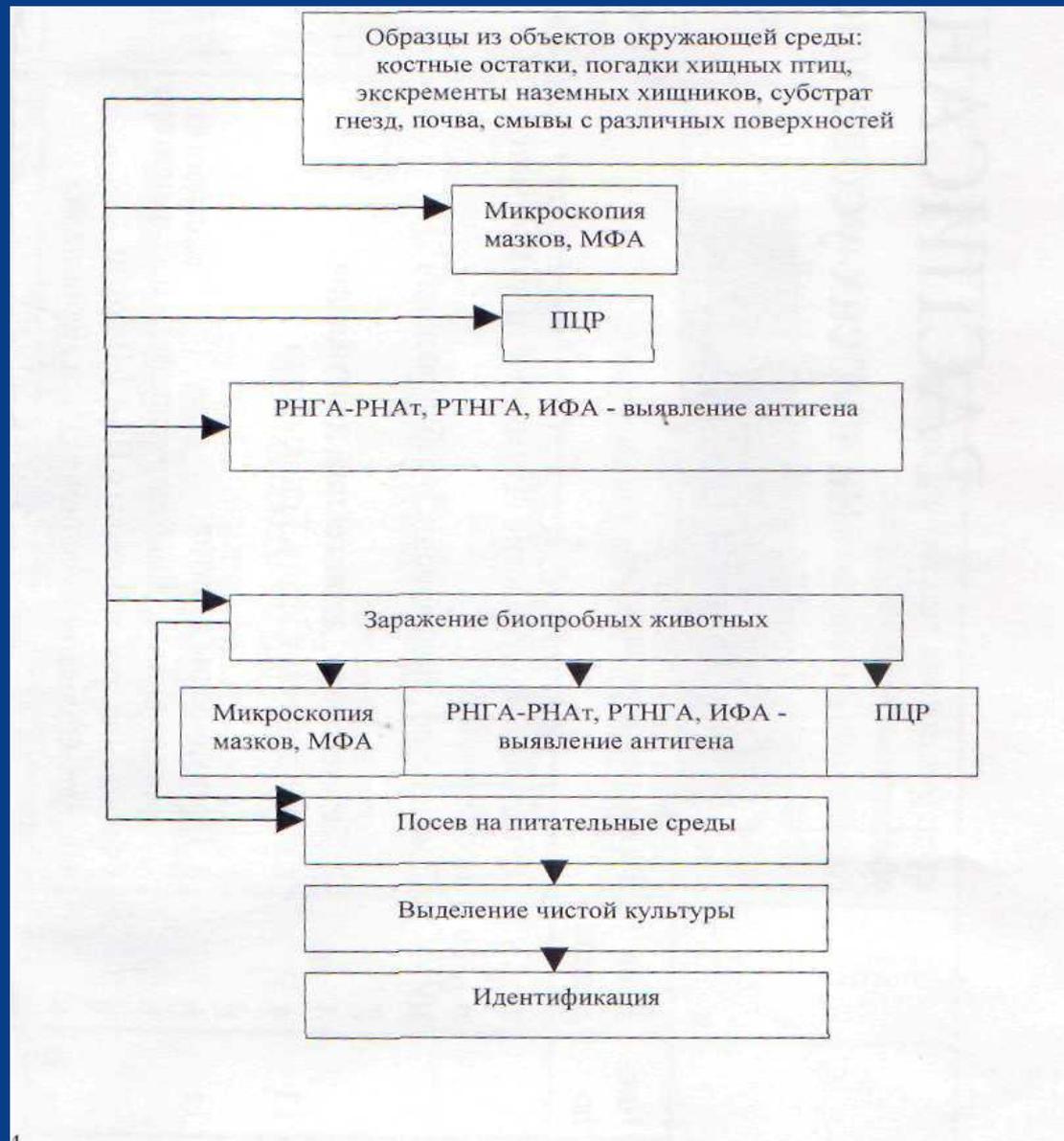
## Особенности анализа материала от трупов грызунов, подобранных в поле

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

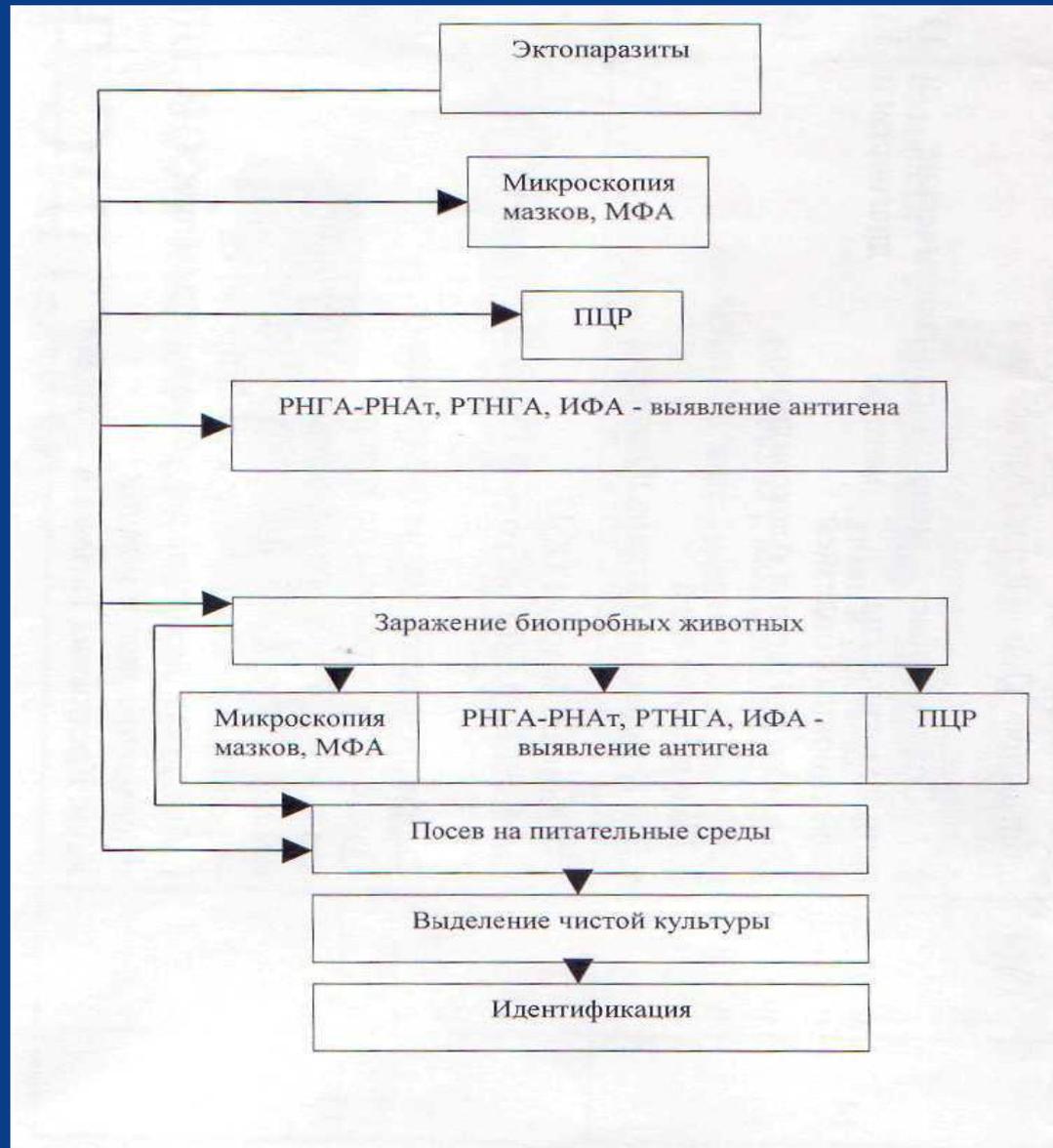
- бактериоскопия
- посев органов, крови из сердца на агар с сульфитом натрия (лизированной кровью) и гв (лучше в двух концентрациях)/ фосфамицином
- посев костного и головного мозга на отдельные агаровые пластины с 2-мя концентрациями гв и со стимулятором роста
- постановка биопроб: б/м (п/к и н/к, или 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

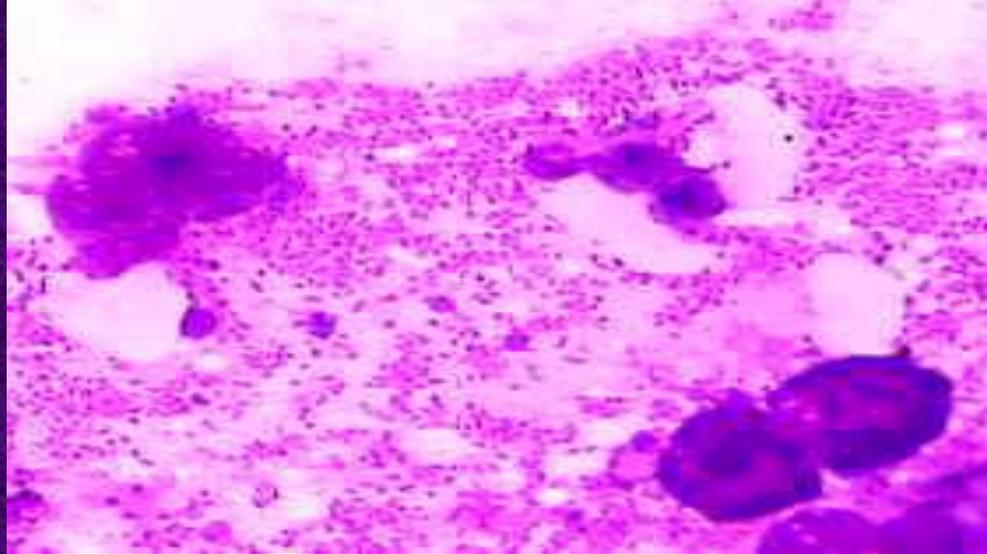
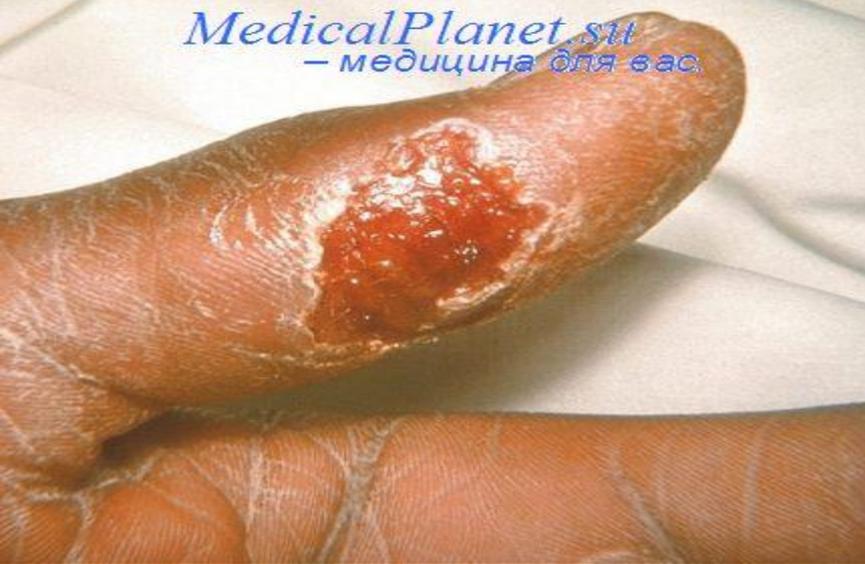
## Экспресс- индикация и идентификация:

- 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»

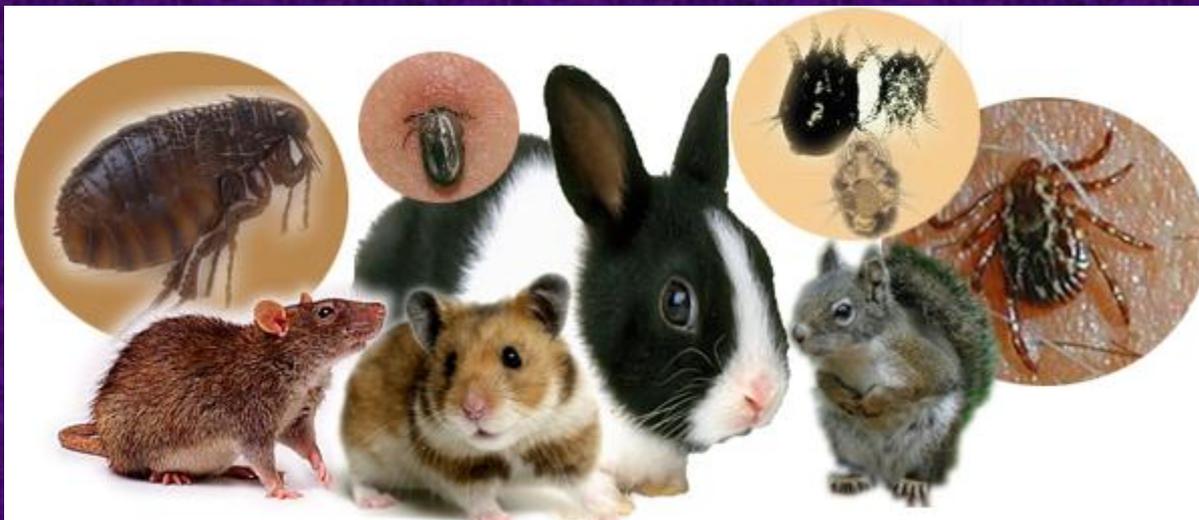
# Определение культурально-морфологических и биохимических свойств

## 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»



# Лабораторная диагностика туляремии



**Туляремия** - генерализованная инфекционная болезнь, протекающая с лихорадкой и характеризующаяся развитием гранулем во многих органах.

Относится к природно-очаговым инфекциям.

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

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:

Надцарство: *Procaryota*

Царство: *Bacteria*

Тип: *Proteobacteria*

Класс: *Grammaproteobacteria*

Отряд: *Thitrichales*

Семейство: *Francisellaceae*

Род: *Francisella*

Вид: *Francisella tularensis*

Вид *F. philomiragia* - является условно патогенным

## *Francisella tularensis*

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

# *Francisella tularensis*

Выделяют три подвида:

- неарктический,
- среднеазиатский
- голарктический
  - японский биовар
  - биовар I Ery(S)
  - биовар II Ery(R)

# Внутривидовые таксоны *F. tularensis*

Географическая раса	Патогенность		Фементация глицерина	Цитруллин-уреидаза
	Для человека	Для животных		
<i>F. tularensis nearctica</i>	Высокая	Высокая	+	+
<i>F. tularensis palearctica (holartctica)</i>	Умеренная	Умеренная	-	-
<i>F. tularensis var. japonica</i>	Умеренная	Умеренная	+	-
<i>F. tularensis var. mediaasiatica</i>	Умеренная	Умеренная	+	+

## 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 1мин.
- чувствителен к аминогликозидам, стрептомицину, гентамицину, канамицину, тетрациклинам, хлорамфениколу и хинонам, но резистентен к пенициллинам, цефалоспорином и полимиксину.

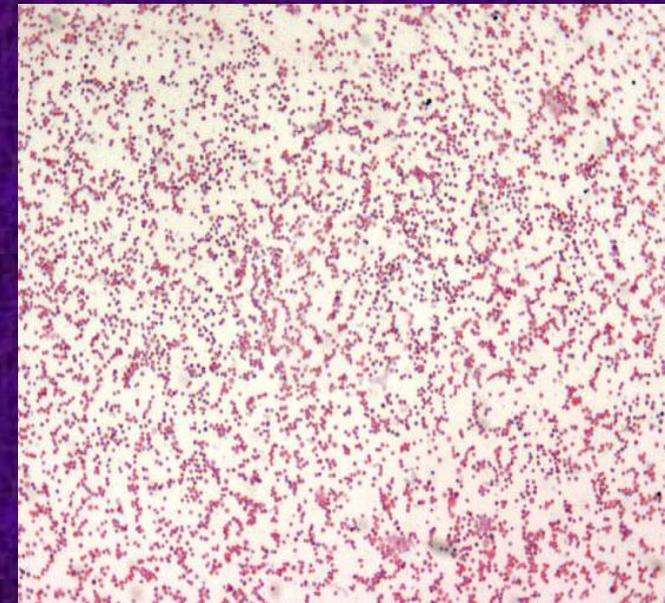
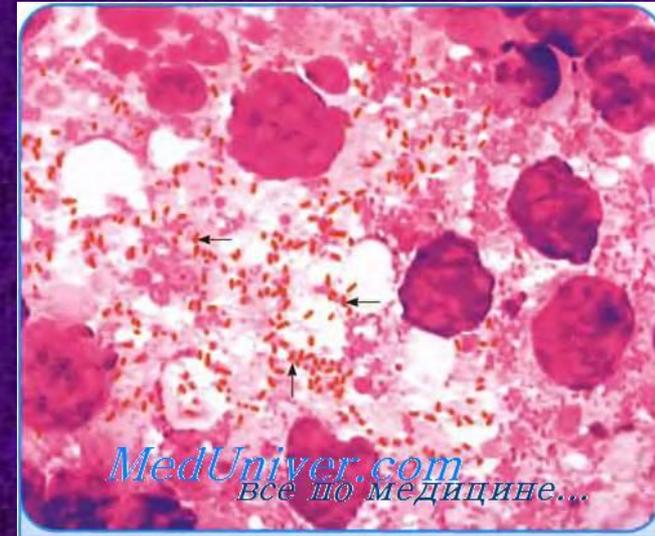
# Морфология:

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.

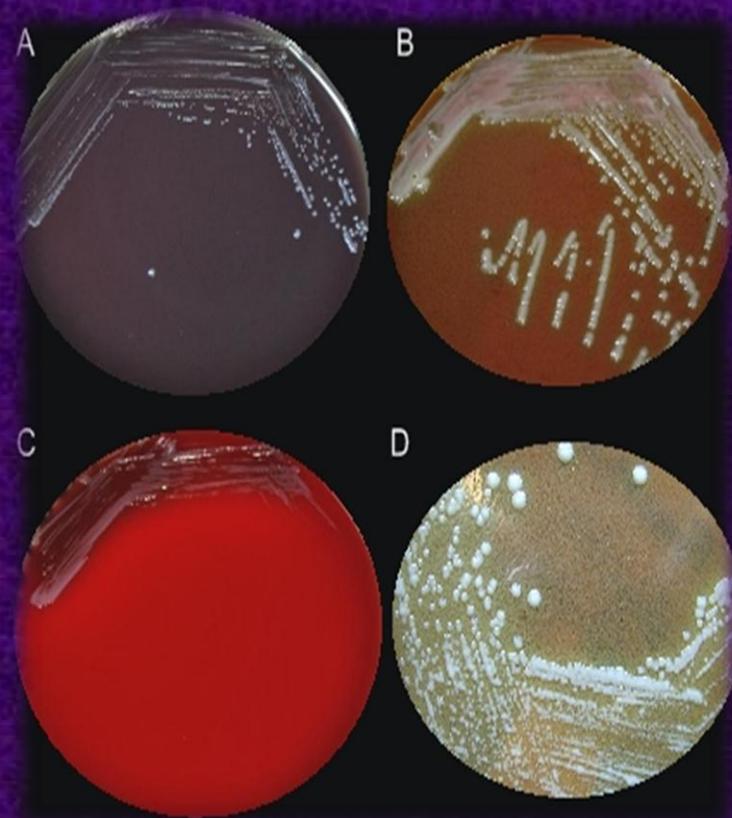
При культивировании на:

- 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 .

- **Подвид *tularensis.*** Ферментирует глицерин, содержит цитруллинуреидазу.

- **Подвид *holarctica.*** Не ферментирует глицерин, не содержит цитруллинуреидазу. Вариант *Japonica*

- ферментирует глицерин.

- **Подвид *mediasiatica.*** Бактерии ферментируют глицерин. Содержит цитруллинуреидазу.

- **Подвид *novicida*** Содержит цитруллинуреидазу, глицерин ферментирует –вариабельно.

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.

Вирулентность туляремийного микроба зависит от его подвида.

1. Подвид *nearctica* (тип А):

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

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

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

3. 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 неиммунногенными. После обработки микробных клеток S-штаммов Vi-сывороткой у них выявлялся капсулоподобный покров.



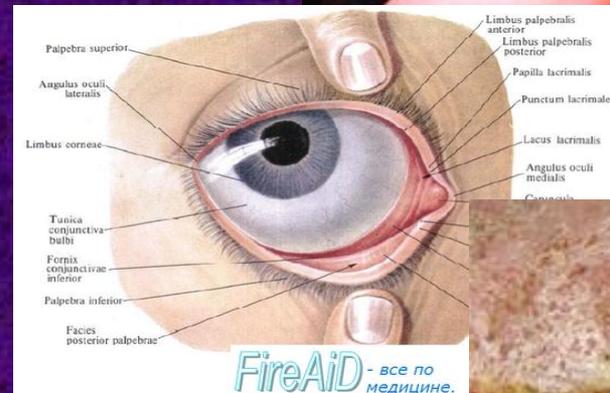
# Объекты подлежащие исследованию на туляремию

## 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.



# 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.



# 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

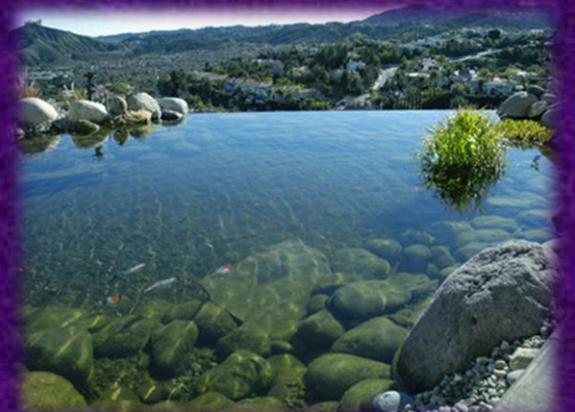
Пробы воды (100-200 мл) берутся в затененном месте, на глубине 10-20 см от поверхности стоячей (слабо проточной) воды в стерильные бутылки (200-250 мл).

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.



## Подготовка погадок птиц и помета хищных млекопитающих

Материал просушивают и взвешивают каждую пробу до 0,1 г. Дальнейшую обработку проводят 2 способами.

**Первый способ** - взвешенный образец помещают в пакетик, верхний край его перегибают и сшивают. Затем шприцем непрерывного действия через прокол верхнего края пакета в него вводят подогретый (до 70 °С) 0,9 % раствор NaCl. Содержимое пакета разминают в однородную массу и через 20-30 мин. отжимают в пробирку, отрезав нижний край пакета. Суспензию обеззараживают, адсорбируют. Через 20-30 мин. суспензию центрифугируют 10-15 мин. (2000 об./мин.).

**Второй способ** - погадку (или помет) растирают пестиком в фарфоровой ступке с подогретым до 70 °С 0,9 % NaCl. Полученную взвесь отсасывают через кусок стерильной ваты пастеровской пипеткой, переносят в пробирку и обеззараживают. Затем суспензию фильтруют на стеклянной воронке с асбестовым фильтром до получения прозрачной жидкости.

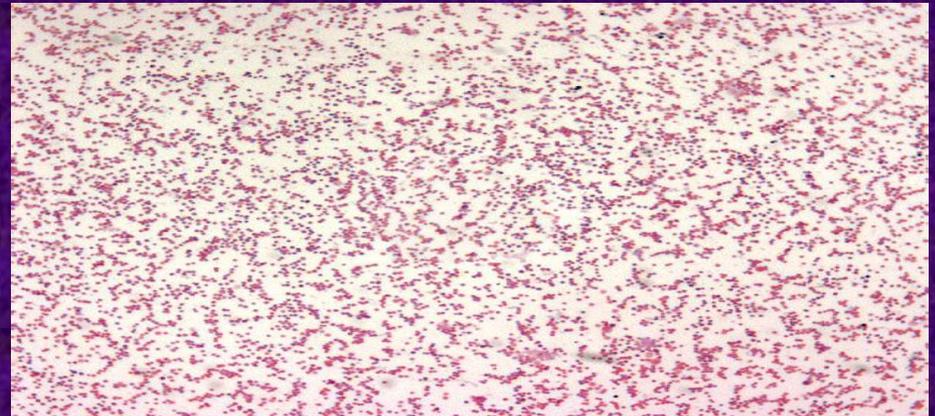
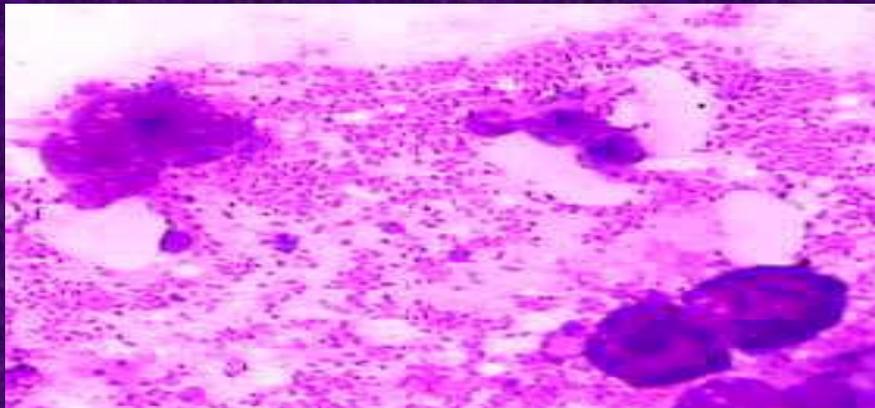
# Методы лабораторной диагностики

## 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.

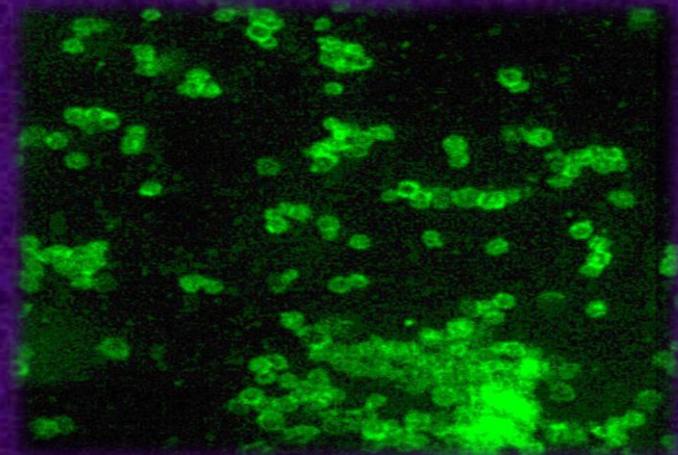
При идентификации возбудителя туляремии может быть применена окраска бактерий по Граму. При этом клетки *F. tularensis* окрашиваются в слабо-розовый цвет.



## 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 противочумный Роспотребнадзора
- Ставропольский институт



# Бактериологический метод

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

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.

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

# 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.

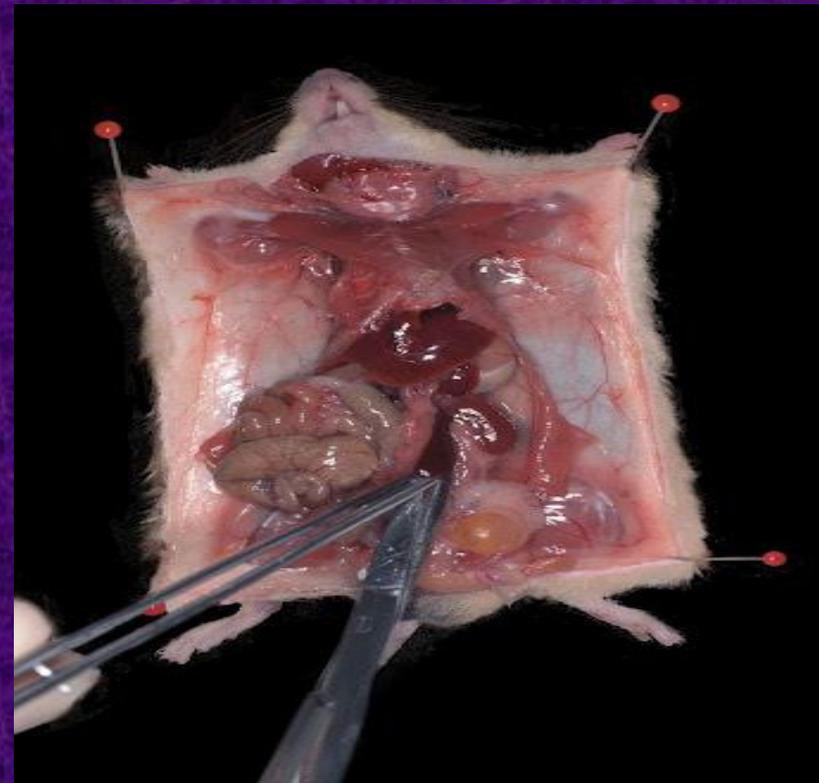
Животных заражают **подкожно** б/м - 0,5 мл, м/с - 1-2 мл.

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  $t$  ( $100 \pm 1$ ) °С - 20 мин, с добавлением формалина до 2 % и оставляют на 2 ч. при  $t$  ( $22 \pm 4$ ) °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  $t$  ( $100 \pm 1$ ) °С 20 мин., выдерживают 2 ч. при  $t$  ( $22 \pm 4$ ) °С, фильтруют.

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

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

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

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

## Иммуноферментный анализ (ИФА)

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

Используют иммуноферментную тест-систему для выявления возбудителя туберкулеза в иммуноферментном анализе (Ставропольским НИПЧИ).



## Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА)

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

Используют  
эритроцитарный  
иммуноглобулиновый  
(Ставропольский НИПЧИ)

диагностикум  
туляреминый  
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 туляреминый (Ставропольский НИПЧИ).

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

### **Исследование методом ПЦР.**

Метод превышает по чувствительности серологические тесты и используется для индикации и ускоренной диагностики туляремии. Для проведения исследований используют генодиагностические препараты.

К таким препаратам относятся экспериментальные серии:

- «ГенТул» (производство РосНИПЧИ «Микроб»)
- «АмплиСенс *F. Tularensis*-FRT» - (производство ЦНИИ эпидемиологии, г. Москва).

# 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 антителат 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.

**ИФА** на твердом носителе используют для диагностики туляремии у больных и переболевших людей, определения иммунитета у вакцинированных.

У больных туляремией специфические антитела обнаруживаются между 6-10 днями, затем уровень их снижается, но они длительно (более 10 лет) выявляться после перенесенного заболевания.

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.

## 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) патогенность для белых мышей и морских свинок;
- 6) выявление в ПЦР видоспецифичных ДНК-мишеней.

## ВНУТРИВИДОВОЕ ТИПИРОВАНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУЛЯРЕМИИ

- ферментация глицерина,
- цитруллинуреидазная актив-ность,
- фосфатазная активность,
- пенициллиназная активность,
- вирулентность для кроликов,
- выявление подвидспецифических генетических маркеров с помощью ПЦР.

Для определения подвигов туляремийного микроба используют следующие тесты:

➤ ферментация глицерина

Производят посев полной стандартной петли культуры, посевы инкубируют при температуре 37 °C 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 цитруллинуреидазной 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  $1 \times 10^6$  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 <sup>-</sup>	Гр <sup>-</sup>	Гр <sup>-</sup>	Гр <sup>-</sup>
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 <sub>2</sub> S на среде с цистеином	+	+	+	+
Образование H <sub>2</sub> 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 <sub>50</sub> для кроликов, м.к.	< 10 <sup>1</sup>	> 10 <sup>6</sup>	> 10 <sup>6</sup>	> 10 <sup>6</sup>
Минимальная заражающая доза для мышей, м.к.	1-10	1-10	1-10	> 10 <sup>3</sup>
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

### Схема 6.3. ЛАБОРАТОРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА НА ТУЛЯРЕМИЮ





*F. tularensis* Schu шоколадный агар, 72 ч.



*F. tularensis* на агаре ЧАВ. Опаловый блеск при косом свете



*F. tularensis* Schu 6 % кровяном агаре, 72 ч.



*F. tularensis* Schu на 9 % шоколадном агаре с цистеином, 72 ч.

