3.1. ПРОФИЛАКТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Эпидемиологический надзор за туляремией

Методические указания
МУ 3.1.2007—05

gost.e-ecolog.ru

1. Разработаны: Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Ю. М. Федоров, Н. Я. Жилина, О. С. Хадарцев); ГУ Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи РАМН (А. Л. Гинцбург, И. С. Мещерякова); ФГУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора (В. И. Жуков, А. А. Иванова, Э. Ф. Опочинский, В. Б. Сильверстов); Российским научно-исследовательским противочумным институтом «Микроб» (А. М. Кокушкин, В. В. Кутырев, Е. В. Куклев, А. С. Васенин, М. А. Тарасов, Т. Н. Донская, А. Н. Куличенко, И. Н. Шарова).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 16 июня 2005 г. (протокол № 2).

3. Утверждены и введены в действие Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 9 сентября 2005 г.

4. Введены взамен методических указаний: «Эпидемиологический надзор за туляремийной инфекцией», «Эпизоотологический мониторинг за природными очагами туляремии», «Лабораторная диагностика туляремии», «Профилактика туляремии», утвержденных приказом Минздрава России от 14 апреля 1999 г. № 125 «Об усилении мероприятий по профилактике туляремии».

Содержание

1. Область применения 104
2. Общие положения 104
3. Эпидемиологический надзор за туляремией 105
3.1. Эпидемиологические особенности туляремии 105
3.2. Эпидемиологическое расследование случаев заболевания туляремией людей 108
3.3. Порядок информации 109
3.4. Задачи эпидемиологического надзора за туляремией 110
4. Эпизоотологический мониторинг за природными очагами туляремии 111
4.1. Градация территории по степени активности природных очагов туляремии 111
4.2. Тактика эпизоотологического обследования 112
4.3. Организация эпизоотологического обследования 113
4.4. Лабораторное исследование зоопаразитологического материала на туляремию 116
5. Лабораторная диагностика туляремии у людей 126
5.1. Аллергические и серологические методы 126
5.2. Бактериологический метод исследования 131
5.3. Биологический метод исследования 132
5.4. Иммунофлуоресцентный метод 132
5.5. Молекулярно-генетический метод 133
5.6. Идентификация выделенной культуры 133
5.7. Значение лабораторных исследований при диагностике туляремии 134
6. Профилактика туляремии 134
6.1. Специфическая профилактика 134
6.2. Неспецифическая профилактика туляремии 137
6.3. Специальная подготовка медицинских и других работников на территории, энзоотичной по туляремии 139
6.4. Гигиеническое обучение и воспитание населения 139
7. Библиографические данные 140
Приложение 1. Краткое описание природных очагов туляремии на территории Российской Федерации 141

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный врач
Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
9 сентября 2005 г.
Дата введения: с момента утверждения

3.1. ПРОФИЛАКТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Эпидемиологический надзор за туляремией

Методические указания
МУ 3.1.2007—05

1. Область применения

1.1. Методические указания определяют комплекс мероприятий по организации и проведению эпидемиологического надзора и профилактики заболеваний туляремией на территории Российской Федерации.

1.2. Методические указания предназначены для использования органами и учреждениями Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, а также могут использоваться органами и учреждениями здравоохранения и другими организациями, деятельность которых направлена на осуществление профилактических мер по охране здоровья населения.

2. Общие положения

2.1. На территории Российской Федерации определяется наличие природных очагов туляремии, эпизоотическая активность которых подтверждается спорадической заболеваемостью людей и выделением возбудителя туляремии от грызунов, членистоногих, из объектов внешней среды или выявлением антигена в погадках птиц и помете хищных млекопитающих.

2.2. В последнее десятилетие (1995—2004 гг.) регистрируются преимущественно спорадическая и групповая заболеваемость, которая ежегодно колеблется в пределах 50—100 случаев. В 1995 и 1998 гг. регистрировалась вспышечная заболеваемость, при которой число больных в Российской Федерации составило 379 и 154 соответственно.

2.3. Эпидемиологический надзор за туляремией – это комплекс мероприятий, включающий слежение за эпизоотическими проявлениями туляремии в природных очагах, анализ многолетней заболеваемости различных возрастных и профессиональных контингентов населения и состояния иммунной структуры населения с целью проведения профилактических и противоэпидемических мероприятий, направленных на предупреждение заражения людей этой инфекцией.

2.4. Организацию и проведение мероприятий по эпидемиологическому и эпизоотологическому надзору в природных очагах туляремии осуществляют территориальные управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и

благополучия человека по субъектам Российской Федерации, железнодорожному транспорту (далее – *территориальные управления*), федеральные государственные учреждения здравоохранения «Центры гигиены и эпидемиологии» в субъектах Российской Федерации, на железнодорожном транспорте (далее – *центры гигиены и эпидемиологии*), противочумные учреждения во взаимодействии с территориальными органами федеральных органов исполнительной власти, органами исполнительной власти субъектов Российской Федерации, органами местного самоуправления, общественными объединениями и иными организациями.

2.5. Объем и направленность профилактических мероприятий определяются характером эпизоотических и эпидемических проявлений, результатами эпизоотологического мониторинга, а также прогнозами эпизоотической и эпидемической ситуации по туляремии в конкретных природных очагах. На основании полученных данных осуществляют планирование профилактических и противоэпидемических мероприятий.

2.6. Территориальные управления, на обслуживаемой территории которых обнаружены природные очаги туляремии, разрабатывают комплексный план профилактических мероприятий, направленных на предупреждение эпидемических проявлений туляремии, совместно с курирующими противочумными учреждениями, органами управления здравоохранением, территориальными органами федеральных органов исполнительной власти, органами исполнительной власти субъектов Российской Федерации, органами местного самоуправления и другими организациями сроком на 5 лет с ежегодным корректированием.

2.7. Прогноз эпизоотического и эпидемического состояния природных очагов туляремии Российской Федерации составляется ФГУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» (далее – *Федеральный центр гигиены и эпидемиологии*) совместно с ФГУЗ «Противочумный центр» (далее – *Противочумный центр*) на основе материалов, представляемых территориальными управлениями и противочумными станциями.

2.8. Консультативно-методическую и практическую помощь территориальным управлениям и центрам гигиены и эпидемиологии в субъектах Российской Федерации по вопросам профилактики и проведению противоэпидемических мероприятий на территории природных очагов туляремии осуществляют Центр по туляремии Минздрава России ГУ НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи РАМН – в соответствии с приказом Минздрава России и Российской академии медицинских наук от 05.01.00 № 2/2 «О переименовании республиканских центров на базе лабораторий НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи РАМН в центры Минздрава России», а также Противочумный центр, противочумные станции, научно-исследовательские противочумные институты – в соответствии с приказом Минздрава России от 05.02.04 № 37 «О взаимодействии по вопросам обеспечения санитарной охраны территории Российской Федерации и проведения мероприятий по профилактике карантинных и других особо опасных инфекций».

2.9. Координацию всех мероприятий по эпидемиологическому надзору за туляремией на территории Российской Федерации, а также контроль выполнения требований к его организации, осуществляет федеральный орган исполнительной власти, уполномоченный осуществлять государственный санитарно-эпидемиологический надзор.

3. Эпидемиологический надзор за туляремией

3.1. Эпидемиологические особенности туляремии

Характерной особенностью эпидемиологии туляремии является множественность механизмов заражения и путей передачи возбудителя инфекции, почти 100 %-я восприимчивость к ней людей, без различий пола и возраста, отсутствие передачи инфекции от человека к человеку.

Заражение людей происходит в природных (или во вторичных синантропных) очагах этой инфекции.

Трансмиссивный (инокулятивный) механизм заражения человека осуществляется в результате укусов инфицированными кровососущими членистоногими (комарами, слепнями, клещами).

Контактный – через поврежденные и неповрежденные кожные и слизистые покровы при соприкосновении с больными или павшими грызунами и зайцами.

Алиментарный – при употреблении продуктов питания (хлеб, печенье, сухари и т. д.), сельскохозяйственной продукции (зерно, свекла и т. д.) и воды (колодезной, горных ручьев и других открытых водоемов), инфицированных больными грызунами.

Аспирационный – при вдыхании воздушно-пылевого аэрозоля, образующегося при переработке зерна и перекладке сена, соломы, инфицированных больными грызунами, а также в результате вдыхания капельно-жидкого аэрозоля, образующегося в процессе мойки и резки свеклы и других кормов, контаминированных выделениями больных туляремией грызунов.

На риск заражения оказывают влияние особенности того или иного типа природного очага, а также формы хозяйственной деятельности, в процессе которой осуществляется взаимодействие человека с природными очагами.

Зарегистрированы случаи заболевания людей на производствах, связанных с переработкой природного сырья (сахарные, крахмалопаточные, спиртовые, пеньковые заводы, элеваторы и т. п.), на мясокомбинатах, при забое овец и крупного рогатого скота, на котором имелись инфицированные клещи, на окраинах городов, расположенных вблизи природных очагов. Известны случаи завоза инфекции при транспортировании продуктов и сырья из неблагополучных по туляремии районов.

Контактный и аспирационный механизмы передачи туляремийной инфекции могут быть реализованы в условиях лабораторий, работающих с материалом, подозрительным на инфицирование возбудителем туляремии.

В соответствии с разнообразием механизмов (условий) заражения людей и факторами передачи инфекции, при которых произошло заражение, различают следующие основные эпидемиологические типы заболеваний людей туляремией.

3.1.1. Трансмиссивный тип

Источниками инфекции являются водяные полевки, реже – зайцы. Механизм заражения людей – трансмиссивный – через укус двукрылых (комаров, слепней) или контактный – при раздавливании инфицированного насекомого на коже или попадании его в глаз. Преобладают ульцерогландулярная и гландулярная (язвенно-бубонная и бубонная) формы заболевания. Заболевания происходят чаще в пойменно-болотных природных очагах во время сенокоса, охоты, рыбалки и других видов деятельности человека вблизи водоемов. Заболевания начинают регистрировать в конце июня, наибольший подъем – в августе и последние случаи – в сентябре.

Источниками инфекции служат восточно-европейская и обыкновенная полевки, хомяки, зайцы и другие млекопитающие. Заражение людей происходит через иксодовых клещей. Формы заболевания такие же, как в предыдущем варианте. Заболевания регистрируют весной и осенью в степных, луго-полевых и реже – в лесных природных очагах туляремии.

3.1.2. Промысловый тип

Заражение людей происходит при промысле водяных полевок, хомяков, зайцев, ондатр, кротов. Механизм заражения – контактный, через скарифицированные кожные

покровы, но могут иметь место алиментарный и аспирационный механизмы заражения. Преобладает гландулярная (бубонная) форма заболевания, реже встречается ульцерогландулярная, ангинозно-гландулярная, окулогландулярная (язвенно-бубонная, ангинозно-бубонная, глазно-бубонная) и другие.

3.1.3. Охотничье-пищевой тип

Заражение людей происходит во время охоты на зайцев, ондатр и других млекопитающих, при снятии шкурок, разделке тушек и употреблении в пищу недостаточно термически обработанного или малосольного мяса, а также при втирании инфицированными руками возбудителя в слизистую оболочку глаза. Преобладают контактный и алиментарный механизмы заражения.

На весну приходится более $^1/_3$ годовых заражений от зайцев. Второй подъем заболеваний регистрируют осенью, в начале сезона охоты. В годы интенсивных эпизоотий в популяциях мышевидных грызунов отмечается третий, зимний подъем заболеваемости. При этом возможны заражения охотников, ночующих в стогах сена и соломы, в которых много мышевидных грызунов. Клинические формы – самые разнообразные. Преобладает гландулярная, ульцерогландулярная, желудочно-кишечная (бубонная, язвенно-бубонная и абдоминальная). В 25 % случаев заболевают как сами охотники, так и члены их семей, имевшие контакты с зараженными животными.

Промысловый и охотничье-пищевой тип заболеваемости часто наблюдается в очагах пойменно-болотного, луго-полевого, степного и лесного типов.

3.1.4. Водный тип

Заражение людей происходит через контаминированную возбудителем воду ручьев и других открытых водоисточников. Основным источником инфицирования воды являются водяные полевки, ондатры, полевки-экономки. Механизм заражения преимущественно алиментарный, реже – контактный (купание в зараженном источнике, умывание, переход вброд, полоскание белья, полив огорода и т. п.). Преобладают ангинозно-гландулярная и гландулярная (ангинозно-бубонная и бубонная) клинические формы заболевания. Заболевания часто возникают в летний период в очагах пойменно-болотного типа, в предгорно-(горно-)ручьевых очагах.

Заражение людей происходит через инфицированную воду колодцев и местных водопроводов. Источниками заражения воды являются домовые мыши и обыкновенные полевки, случайно попадающие в водоисточники. Заражаются лица, имеющие общий источник водопользования. Механизм заражения алиментарный (питье воды), реже контактный (умывание). Преобладают ангинозно-гландулярная и гландулярная (ангинозно-бубонная и абдоминальная) формы болезни. Заболевания большей частью происходят в холодное время года в луго-полевых, степных и синантропных очагах туляремии.

3.1.5. Сельскохозяйственный тип

Заражение людей чаще всего происходит воздушно-пылевым аэрозолем от инфицированных больными грызунами соломы, сена, зерна и других субстратов при их использовании в хозяйственных целях.

Источниками инфицирования субстратов являются обыкновенные полевки, домовые мыши и некоторые другие мелкие грызуны и насекомоядные (землеройки), заселяющие в осенне-зимнее время стога сена, ометы соломы, овоще- и зернохранилища. Заражение людей происходит обычно при разборке, переработке сена, соломы, раздаче кормов, переборке овощей и т. п. Преобладает аспирационный механизм заражения и легочная (то-

ракальная) форма болезни, реже желудочно-кишечная и ангинозно-гландулярная (абдоминальная и ангинозно-бубонная) форма. Заболевания отмечаются, начиная с октября, особенно часты в декабре-январе и оканчиваются в марте. Характерны для луго-полевых, степных, реже – пойменно-болотных природных очагов туляремии.

3.1.6. Бытовой тип

Заражение происходит через инфицированные субстраты и возникает непосредственно в быту (дома, на усадьбе). Больные грызуны либо сами мигрируют в населенный пункт, либо их завозят с соломой, зерном, корнеплодами.

Преобладает аспирационный механизм заражения. Заражения происходят во время подметания пола, переборки и сушки сельскохозяйственных продуктов, раздачи корма домашним животным или при употреблении в пищу инфицированных продуктов и т. п. Регистрируются чаще легочная (торакальная), реже – ангинозно-гландулярная и желудочно-кишечная (ангинозно-бубонная и абдоминальная) формы болезни. Заболевания наиболее часто регистрируются с ноября по апрель двумя волнами. Первая – в ноябре-январе; вторая – в марте-апреле.

3.1.7. Продуктовый тип

Факторами передачи инфекции служат продукты, инфицированные на складе, в магазине, столовой и т. п. Механизм заражения преимущественно алиментарный. Клинические формы болезни чаще желудочно-кишечная (абдоминальная), реже – ангинозно-гландулярная (ангинозно-бубонная).

3.1.8. Производственный тип

Заражения возникают при использовании инфицированных сельскохозяйственных продуктов на перерабатывающих предприятиях (сахарные, пивоваренные, крахмалопаточные, спиртовые, пеньковые заводы, элеваторы и т. п.). Основной механизм заражения – аспирационный. Заражения чаще происходят в цехах первичной обработки продукции. При завозе инфицированного сырья заражения могут возникать и на неэнзоотичных территориях. Заболевания чаще имеют место с ноября по февраль, реже – в ранне-весенний период. Преобладает легочная (торакальная) форма заболевания.

Заражение людей происходит при забое животных и разделке мяса (от инфицированных клещей, находящихся на овцах и крупном рогатом скоте). Механизм заражения – контактный, форма заболевания – гландулярная (бубонная). Заболевания могут возникать вне территории природного очага.

3.2. Эпидемиологическое расследование случаев заболевания туляремией людей

3.2.1. Каждый случай заболевания туляремией подвергают подробному эпидемиологическому расследованию. Эпидемиологическое расследование проводят не позднее двух суток со дня получения экстренного извещения центром гигиены и эпидемиологии о выявлении случая заболевания человека туляремией, для чего немедленно организуют проведение эпизоотологического обследования очага. Определяют возможный источник и пути передачи инфекции, что используют для проведения и коррекции противоэпидемических мероприятий, направленных на предупреждение новых случаев заболевания.

Механизм заражения определяют по локализации первичного аффекта регионарного бубона, других клинических признаков.

Уточняют, подвергался ли больной вакцинации против туляремии, дату ее проведения, результаты. После вакцинации иммунитет сохраняется 5 и более лет, поэтому заболевания на 4—5-й год после вакцинации редки. Появление заболеваний через несколько месяцев после вакцинации может свидетельствовать либо о неправильной технике введения вакцины или учете результата вакцинации, либо о снижении активности вакцины при нарушении условий транспортирования и хранения.

3.2.2. Эпидемиологическое расследование вспышек или групповых заболеваний не представляет затруднений в связи с однотипностью механизма заражения и клинических проявлений, расследование спорадических случаев заражения требует специального подхода и известных навыков.

3.2.3. Опрос начинают с выяснения места жительства, места работы, командировок, отдыха (рыбалки, охоты, сбора ягод, грибов) в пределах инкубационного периода (3—7 дней). Для летних заражений большое значение имеет проживание или пребывание вблизи водоема, а для зимних – нахождение в сельской местности, выполнение сельскохозяйственных или бытовых работ. Если первичный опрос больного не прояснил ситуацию, проводят опрос членов его семьи, сотрудников или лиц, выезжавших одновременно с ним на территорию природного очага. При групповых и семейных заболеваниях выявляют источники и факторы заражения для своевременной коррекции комплекса противоэпидемических и профилактических мероприятий.

При производственных заболеваниях проводят обследование организаций, в которых произошли заражения людей.

3.2.4. Со сбором анамнестических данных проводят зоолого-паразитологическое и лабораторно-диагностическое обследование эпидемического очага и окружающей территории.

3.2.5. Результаты эпидемиологического расследования случая заболевания туляремией вносят в карту эпидобследования очага установленной формы. При этом указывают общие сведения о больном, дату заболевания, первичный диагноз, дату установления диагноза туляремии и госпитализации, сведения о клинической форме и характере течения заболевания, результаты лабораторного обследования больного, а также эпидемиологическое заключение о предполагаемом источнике, механизме и месте заражения. Проводят анализ причин заболеваемости, который служит дальнейшему совершенствованию профилактических мероприятий.

Заключение по расследованию должно содержать краткую характеристику причин возникновения вспышки (спорадических или групповых случаев заболеваний) туляремии, анализ обоснованности, своевременности и эффективности проведенных противоэпидемических мероприятий (выявление источника и фактора передачи инфекции и полноты обеспечения специфической и неспецифической профилактики).

При диагностировании заболевания туляремией у больного, предположительно заразившегося в процессе работы, связь заболевания с профессиональной деятельностью больного устанавливает специалист территориального управления, проводящий эпидемиологическое обследование в очаге заражения. Основным документом, подтверждающим профессиональный характер заражения туляремией, служит карта эпидемиологического обследования установленной формы с заполненным вкладным листом, заверенная начальником территориального отдела территориального управления.

3.3. Порядок информации

3.3.1. О каждом случае выявления больного туляремией территориальный отдел информирует территориальное управление Роспотребнадзора.

3.3.2. Копию «карты эпизоотолого-эпидемиологического обследования» случая заболевания туляремией направляют в противочумный центр.

3.4. Задачи эпидемиологического надзора за туляремией

3.4.1. Задачами эпидемиологического надзора являются:

- слежение за заболеваемостью туляремией, ее территориальным распределением и заболеваемостью отдельных групп населения (городского, сельского, по возрастным и профессиональным группам);
- установление преобладающих клинических форм, тяжести заболевания, сроков диагностики, эпидемиологических типов заболеваемости;
- контроль за численностью населения, подвергающегося риску заражения на территории природных очагов туляремии и определение уровня охвата его профилактическими прививками;
- разработка тактики вакцинопрофилактики групп населения, привлекаемых на временные работы на энзоотичные по туляремии территории;
- оценка состояния противотуляремийного иммунитета (иммунологическая структура) населения, проживающего (или временно работающего) на территориях природных очагов туляремии;
- слежение за динамикой эпидемиологически значимых социальных явлений (миграция населения, характер хозяйственной деятельности, санитарно-гигиенические условия, уровень медицинского обслуживания и др.);
- слежение за динамикой популяций носителей и переносчиков инфекции;
- своевременное выявление эпизоотий среди диких животных, определение их интенсивности, границ распространения;
- анализ факторов, определяющих динамику эпизоотического процесса, и обоснование прогноза его развития;
- выяснение основных закономерностей эпизоотического процесса, выяснение возможных механизмов сохранения и распространения возбудителя на каждой конкретной территории;
- эпизоотологическая дифференциация очаговых территорий для определения конкретных мер профилактики для каждой из них;
- изучение биологических свойств возбудителя, обнаруживаемого на территории;
- выявление обсемененности возбудителем туляремии объектов окружающей среды (вода, корма, гнезда грызунов и др.);
- проведение дератизационных и дезинсекционных мероприятий, направленных на уничтожение и (или) сокращение численности носителей и переносчиков возбудителя.

3.4.2. Основой эпизоотолого-эпидемиологического надзора за туляремией является обследование природных очагов туляремии, которое осуществляют в плановом порядке и по эпидемиологическим показаниям.

Предпосылкой для начала эпизоотолого-эпидемиологического обследования по эпидпоказаниям служит экстренное извещение о случае (случаях) туляремии у людей или выявление возбудителя у млекопитающих, членистоногих и в объектах окружающей среды (воде, кормах и др.).

О проявлении эпизоотической активности природного очага туляремии в ряде случаев становится известно после регистрации заболевания человека. Однако и в этом случае необходимо определить источник и обстоятельства заражения человека для своевременной коррекции противоэпидемических и профилактических мероприятий с целью предупреждения дальнейших случаев заражения людей в природном очаге.

Эпизоотическую ситуацию оценивают на основании эпизоотологического обследования, при котором регистрируют изменения численности грызунов и кровососущих членистоногих, а также по результатам лабораторных исследований, подтверждающих наличие возбудителя (или антигена) в различных объектах. На основании этих данных готовят мотивированное заключение о наличии на данной территории в настоящее время туляремийной эпизоотии.

3.4.3. Анализ полученной первичной информации является основой дальнейших действий по проведению профилактических и противоэпидемических мероприятий, основными из которых являются следующие:

- выявление источников инфекции и обстоятельств заражения людей;
- отбор проб для лабораторного исследования объектов, подозреваемых в качестве источников или факторов передачи возбудителя;
- определение круга лиц, подвергшихся риску заражения от выявленного источника или фактора передачи;
- проведение экстренной специфической профилактики лицам, подвергающимся риску заражения (или проживающим на территории выявленного активного природного очага туляремии);
- проведение экстренной дератизации, дезинсекции и дезинфекции в отношении вероятных источников и факторов передачи инфекции: уничтожение трупов диких млекопитающих, кормов, сельскохозяйственного сырья при обнаружении возбудителя туляремии. Учитывая, что больной человек не является источником инфекции, дезинфекции подвергаются те объекты, которые определены как факторы передачи возбудителя человеку.

При туляремии оценка потенциального риска заражения населения базируется в основном на результатах эпизоотологического обследования природных очагов и на данных контроля за состоянием противотуляремийного иммунитета населения, подвергающегося повышенному риску заражения.

4. Эпизоотологический мониторинг за природными очагами туляремии

4.1. Градация территории по степени активности природных очагов туляремии

Энзоотичной по туляремии считают территорию (административный район), где были зарегистрированы местные случаи заболевания людей, изолированы культуры возбудителя или регулярно выявлялся антиген в объектах внешней среды (погадки птиц, помет хищных млекопитающих, подснежные гнезда грызунов, вода, фураж и т. п.).

Территориальные управления и центры гигиены и эпидемиологии за такими территориями устанавливают постоянное наблюдение и проводят дифференцированный эпизоотологический мониторинг в зависимости от степени их эпизоотической активности и эпидемической опасности.

Активными природными очагами считают такие, в которых регистрируют случаи заболевания людей (даже единичные), выделяют культуры возбудителя туляремии (от грызунов, членистоногих, объектов внешней среды) или регулярно выявляют туляремийный антиген в погадках птиц и помете хищных млекопитающих (при наличии антигена не менее чем в 10 % образцов в годы высокой численности грызунов при статистически достоверной выборке ≥ 100 погадок, собранных на территории конкретного природного очага). Активные природные очаги следует обследовать ежегодно весной и осенью при минимально необходимых объемах зоолого-паразитологических и лабора-

торных исследований, позволяющих оценить степень эпизоотической активности и эпидемической опасности, но не реже чем весной и осенью.

Малоактивными природными очагами считают такие, в которых заболевания людей и выделение культур возбудителя не регистрируют, но имеют место нерегулярные находки туляремийного антигена в объектах внешней среды. Эти очаги следует обследовать один раз в 2—3 года. Необходимо также осуществлять разведку новых потенциально опасных территорий (1 раз в 3—5 лет) на возможное обнаружение природных очагов туляремии.

Территории, где отсутствует циркуляция туляремийного микроба, в т. ч. под влиянием хозяйственной деятельности человека (полная осушка болот и водоемов на больших площадях, сплошная распашка и последующее освоение крупных земельных массивов при отсутствии лесополос, оврагов и т. п.) считаются неэнзоотичными по туляремии. Последнее должно периодически подтверждаться отрицательными результатами эпизоотологических и эпидемиологических исследований с применением бактериологического, биологического и серологического методов в периоды массового размножения грызунов.

Вопрос о снятии энзоотичности территории решают с обязательным участием Федерального центра гигиены и эпидемиологии, Центра по туляремии на базе НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи РАМН и согласовывают с федеральным органом исполнительной власти, осуществляющим государственный санитарно-эпидемиологический надзор.

4.2. Тактика эпизоотологического обследования

Эпизоотологическое обследование природных очагов туляремии преследует следующие основные цели:

- контроль за состоянием известных очагов туляремии (выявление эпизоотий, определение их интенсивности и экстенсивности, изучение механизмов циркуляции возбудителя, оценка угрозы эпидемических проявлений);
- оценка изменений, происходящих в очагах при антропогенном воздействии и трансформации ландшафтов;
- разведка неизученных или малоизученных территорий для уточнения нозогеографии туляремии, эпизоотологического и эпидемиологического районирования;
- составление кадастра очагов туляремии, обследование которых следует проводить постоянно;
- прогнозирование эпизоотической ситуации и обоснование конкретных мер профилактики;
- составление календарного плана эпизоотологического обследования выявленных очагов туляремии.

Получение этих сведений достигают путем систематического планового обследования территории в минимально необходимом для этого объеме работ.

Эпизоотологическое обследование предусматривает: сбор полевого материала, его лабораторное исследование и последующий анализ полученных данных.

Полевой раздел работ включает:

- изучение природных особенностей территории (рельеф, климат, почвы и т. п.);
- изучение видового состава, биотопического распределения и численности млекопитающих-носителей инфекции и членистоногих-переносчиков; отлов животных и сбор эктопаразитов;
- поиск трупов и следов жизнедеятельности мелких млекопитающих (ММ), объектов окружающей среды;

- доставку этого материала в лабораторию и подготовку его к исследованию;
- изучение особенностей образа жизни животных, которые определяют развитие эпизоотического процесса и условия заражения людей.

Сбор материала для лабораторного исследования обычно сочетают с изучением видового состава и проведением учетов численности ММ и членистоногих переносчиков.

При эпизоотологическом обследовании используют общепринятые зоолого-паразитологические методы и специальные, направленные на поиск туляремийных эпизоотий. Поиски туляремийных эпизоотий в первую очередь производят в тех районах, где в прошлом имели место случаи заболевания людей, были выделены культуры возбудителя или обнаружен антиген в объектах окружающей среды. Каждый район обследуют 1 раз в 1—2 года (в зависимости от активности очага). Имеющиеся стационары или пункты многолетних наблюдений обследуют ежегодно – весной и осенью. По эпидемиологическим показаниям проводят экстренные эпизоотологические обследования. Во всех случаях при обнаружении эпизоотии туляремии выясняют границы ее распространения. Границы эпизоотий определяют следующим способом. По результатам лабораторного исследования материала, собранного на энзоотичной по туляремии территории, картируют все «точки» с положительным результатом и все крайние «точки» соединяют (оконтуривают). На оконтуренной территории отмечают участки с положительными пробами, определяют тип очага, процент зараженных проб, показатели численности носителей и переносчиков, процент зараженных биотопов.

Таким образом, устанавливают пространственно-биоценотическую структуру очага, степень распространения эпизоотии, ее интенсивность и экстенсивность.

При обследовании больших территорий и получении сведений о состоянии очагов туляремии в сжатые сроки используют маятниковый метод обследования. Сущность метода заключается в том, что выезды групп эпизоотологического обследования осуществляют каждый раз в удаленные от предыдущего места обследования районы. В итоге оперативно охватывают обследованием наибольшую площадь энзоотичной по туляремии территории.

4.3. Организация эпизоотологического обследования

Возникновение заболеваний среди людей определяется эпизоотическим состоянием очагов. Разлитые эпизоотии туляремии происходят в годы высокой численности мелких млекопитающих. Повышение численности ММ является важной характеристикой состояния очага и признаком возможного эпидемического неблагополучия. Наблюдения за численностью ММ – одна из основных составляющих эпизоотологического обследования, которое осуществляют на основе различных методов количественного учета ММ. При этом основное внимание уделяют обследованию скирд, ометов, строений, расположенных в окружении природных биотопов, а также зарослей кустарников, опушек широколиственных лесов, облесенных балок и оврагов, участков рудеральной растительности, агроценозов с зерновыми культурами, лесополос, околоводных биотопов, колоний грызунов, заброшенных и временно используемых человеком строений, других мест повышенного риска заражения людей туляремией (зон рекреации, мест заготовок сельскохозяйственной продукции, лесозаготовок и т. п.).

В поисках туляремийных эпизоотий лабораторному исследованию подвергают отловленных разными методами диких ММ или их трупы, собранные в природе, подснежные гнезда грызунов, продукты жизнедеятельности ММ, погадки птиц (ПП), помет хищных млекопитающих (ПХМ), а также солому, мякину, талую воду и другие объекты, загрязненные выделениями грызунов, воду из естественных водоемов и колодцев, гидробионтов и др. Среди членистоногих-переносчиков основное внимание

уделяют иксодовым клещам. Кроме того, исследуют мелких эктопаразитов, собранных с ММ (вшей, гамазовых и краснотелковых клещей, блох). При трансмиссивных вспышках исследуют кровососущих двукрылых (комаров, слепней и др.). Серологические исследования домашних животных производят при соответствующих эпизоотологических и эпидемиологических показаниях.

Всех млекопитающих по отношению к туляремийной инфекции и их роли в эпизоотическом процессе разделяют на 3 группы.

Первая группа. Высоковосприимчивые и высокочувствительные млекопитающие (заражаются при попадании в организм единичных туляремийных бактерий, 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 бактерий, болеют тяжело, но быстро освобождаются от возбудителя, 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 относятся большинство хищных млекопитающих и сельскохозяйственных животных.

Наибольшее эпидемиологическое и эпизоотологическое значение имеют животные 1-й группы, поэтому тактика эпизоотологического обследования строится с учетом того, к какой группе относятся обитающие в очаге животные.

При поисках эпизоотий туляремии в первую очередь исследуют отловленных и трупы животных 1-й группы. Основным методом при этом является бактериологический. Во вторую очередь исследуют животных 2-й группы, а затем животных 3-й группы, которых исследуют бактериологическими и серологическими методами. У животных 1-й группы в небольшом проценте случаев может иметь место хроническая форма туляремии с формированием специфических антител, поэтому целесообразны поиски антител и у зверьков 1-й группы. Наличие антител указывает на контакт зверьков с возбудителем.

Во время зимних лыжных маршрутов под одиноко стоящими деревьями и кустами, на ометах соломы, под столбами и другими возвышениями на снегу можно обнаружить обрывки шкурок ММ, которые хищные птицы сдирают, прежде чем съесть зверька. Иногда на снегу около обрывков шкурок имеются замороженные капли крови. Обрывки шкурок и капли замороженной крови собирают в пробирки и исследуют с помощью биологической пробы. Во время зимнего тропления следов лисы собирают экскременты, обрывки шкурок, остатки трупов ММ и гнездового материала, раскопанных лисой нор ММ. Собранный таким образом материал исследуют путем биологической пробы, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и серологическими методами.

Для рекогносцировочного обследования значительных территорий применяют серологическое исследование ПП и ПХМ на содержание туляремийного антигена. Преимущества метода заключаются в малой трудоемкости процесса сбора и быстроте исследования полевого материала, в возможности за короткий срок обследовать значительные территории открытых ландшафтов и быстро получить ответ о наличии или отсутствии инфекции. Метод применим для раннего и ретроспективного выявления эпизоотии, определения ее границ, установления видов животных, вовлеченных в эпизоотический процесс, и оценки их численности. Поедая в природе преимущественно ослабленных, больных зверьков или их трупы, хищники осуществляют выбор из популяции именно того материала, который желателен для лабораторного исследования.

Погадка представляет собой плотный, продолговатый комок непереваренных птицей частей пищи (шерсть, кости, перья, хитин насекомых и т. п.), выбрасываемый ею через рот по окончании процесса предварительного пищеварения. Образование погадок отмечается у всех хищных птиц, чаек, вороновых и некоторых других. Костные остатки млекопитающих в погадках хорошо сохраняются, что позволяет установить видовую принадлежность съеденных зверьков. Птицы выбрасывают погадки во время отдыха через 10—20 ч после кормежки. Погадка может содержать остатки одного зверька у мелких птиц и нескольких – у крупных хищников. Установлено, что птицы избавляются от погадок недалеко от мест кормежки, и можно считать, что исследование содержимого погадок характеризует именно ту территорию, на которой они собраны (в пределах 2—3 км от точек сбора).

Помет хищных млекопитающих (семейства куньих, собачьих) также состоит из непереваренных частей пищи, видовой состав которой в полевых условиях определить трудно, т. к. они были разжеваны и прошли пищеварительный тракт хищника. Участок охоты хищных млекопитающих, как правило, постоянен и занимает территорию в несколько квадратных километров.

Длительность сохранения погадок и помета в природе зависит от климатических условий местности. В зоне достаточного увлажнения разрушение их происходит в течение 4—5 месяцев под воздействием гнилостных процессов, почвенных видов микро- и мезофауны и различных насекомых. В засушливом климате степей и пустынь они могут сохраняться более длительное время (в течение года и более). Чем свежее погадка и помет, тем они темнее окрашены. Гибель туляремийного микроба в погадках и помете происходит быстро (в первые сутки; при отрицательных температурах, возможно, дольше), в связи с чем бактериологическое исследование этого материала нецелесообразно. Туляремийный антиген сохраняется в погадках и помете в течение всего периода их существования. Для поиска туляремийного антигена в ПП и ПХМ используют ПЦР, серологические методы, чаще всего наиболее простой и доступный – реакцию нейтрализации антител (РНАт).

В бесснежное время года в открытых ландшафтах в течение одного дня можно собрать материал, содержащий остатки большого числа ММ с территории в несколько сотен квадратных километров, если использовать автомашину для передвижения. Труднее, но возможно, проводить сбор ПП и ПХМ зимой. Погадки собирают вблизи гнездовий, мест кормежки, ночевок и отдыха птиц. Обычно это возвышенные предметы, столбы линий электропередач, одиноко стоящие деревья, стога сена и ометы соломы, вышки и т. д. ПХМ можно обнаружить около возвышающихся на местности предметов, а также на охотничьих тропах хищников и на их лежках. ПП и ПХМ собирают обычно ранней весной, сразу после схода снега и поздней осенью. Это позволяет получить характеристику эпизоотийного состояния популяции ММ на протяжении всего года, установить начало и длительность эпизоотии. В пойменно-болотных очагах наиболее удобное время сбора ПП и ПХМ – вторая половина лета, когда возникают эпизоотии среди околоводных видов млекопитающих. В лесных ландшафтах ПП и ПХМ собирают возле гнезд или по кромке леса и опушкам. Непосредственно в лесных массивах особое внимание уделяют сбору ПХМ в зимнее время.

Каждую найденную погадку или пробу помета заворачивают в отдельный лист бумаги во избежание контаминации. Собранный с одного места материал помещают в отдельные матерчатые мешки и этикетируют. Быстрое отмирание туляремийного микроба в кислой среде ПП и ПХМ позволяет проводить их сбор в природе и дальнейшую обработку без специального режима, соблюдая лишь правила обычной гигиены. При необходимости материал может храниться длительное время, если его тщательно просушить.

Сведения о распределении, динамике численности фоновых видов млекопитающих и кровососущих членистоногих, выделении культур возбудителя или находках туляремийного антигена в объектах внешней среды наносят на карты и анализируют.

Обо всех вновь выявленных природных очагах туляремии информируют территориальные управления.

4.4. Лабораторное исследование зоопаразитологического материала на туляремию

4.4.1. Подготовка материала к исследованию и порядок исследования

Успех бактериологического исследования зависит от свежести доставленного материала, поэтому животных или их органы, если они не были заморожены или законсервированы, исследуют немедленно после доставки в лабораторию. Если это не удается, то трупы животных или органы сохраняют на холоде. В первую очередь исследуют зверьков, найденных мертвыми. Перед вскрытием зверьков осматривают и снимают или счесывают с них эктопаразитов. Затем зверьков взвешивают с точностью до 0,5 г, измеряют длину их тела, хвоста, высоту уха и др., что необходимо для точного определения вида добытого животного. При вскрытии определяют пол, возраст и генеративное состояние зверьков. Возможна обработка зверьков на месте сбора, вскрытие и помещение органов в консервант для последующей доставки в лабораторию. Консервантами могут служить вазелино-парафиновая смесь (1 часть парафина – 10 частей вазелинового масла, смесь стерилизуют 45 мин прогреванием на кипящей водяной бане), а также касторовое масло, 5 %-й раствор поваренной соли, глубокое замораживание в жидком азоте и др. В консервантах и при низкой температуре органы животных можно сохранять в течение 1 месяца.

Трупы зверьков, погибших в природе, павших в лаборатории, или животных, у которых при вскрытии обнаружены патолого-анатомические изменения, характерные для туляремии, подвергают индивидуальному исследованию, применяя биологический, бактериологический, молекулярно-генетические, серологические методы. Эти методы сочетают по-разному в зависимости от задач и технических возможностей. Вскрытие зверьков, найденных мертвыми в природе, производят в отдельной кювете и отдельными инструментами. При вскрытии каждого зверька осуществляют тщательную обработку инструментов 96°-м спиртом с последующим обжиганием или смену их с последующим кипячением, а также обработку рук (перчаток) и доски для вскрытия. Необходимо полностью исключить возможность случайного переноса микроба туляремии в другие исследуемые пробы. В трупах животных возбудитель туляремии может быть обнаружен путем бактериоскопии мазков-отпечатков органов или выделен посевом на питательные среды, если органы не подверглись разложению. Посевы из трупов зверьков целесообразнее производить на питательные среды с антибиотиками, предупреждающими рост посторонней микрофлоры. В органах животных 1-й группы туляремийные бактерии могут быть обнаружены микроскопическим исследованием (лучше люминесцентной микроскопией). Использование микроскопии мазков из органов трупов животных 2-й группы может быть безуспешным из-за малой обсемененности их органов туляремийными бактериями. Наряду с микроскопией и посевом органы трупов зверьков исследуют путем биологической пробы, а остатки суспензии используют для постановки ПЦР и серологических реакций (РНАт, реакции иммунофлуоресценции – РИФ и др.). В условиях установленной эпизоотии можно ограничиться посевом и бактериоскопией мазков из органов, сохраняя часть их на холоде до выяснения результа-

тов и выделения возбудителя прямым посевом. В сомнительных случаях (плохая сохранность трупов, отсутствие при вскрытии типичных патолого-анатомических изменений) прибегают к биологическому методу. При этом часть органов оставляют до выяснения результатов посева или биологического исследования. Если биопробное животное погибнет преждевременно от посторонней причины, а посев неудачен, то проводят повторное биологическое исследование. У животных с признаками разложения в первую очередь исследуют костный мозг трубчатой кости. При исследовании сильно разложившихся трупов применяют накожный метод заражения биопробного животного. Трупы животных исследуют параллельно методом ПЦР и серологическими методами (РНАт, РИФ и др.). Трупы животных 2-й и 3-й групп обязательно исследуют биологическим методом, позволяющим выявить даже единичные бактерии. Исследование завершают выделением чистой культуры, ее идентификацией, что служит неоспоримым доказательством зараженности объекта.

Обнаруженные при обследовании природных очагов туляремии мумифицированные трупы, высохшие шкурки и кости зверьков не содержат живых туляремийных бактерий, поэтому такие объекты исследуют методом ПЦР и серологическими методами, позволяющими обнаружить дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) возбудителя или туляремийный антиген.

Основным методом исследования ММ, добытых в природе орудиями лова или живыми, служит биологическая проба. Этот метод позволяет обнаруживать даже единичные бактерии возбудителя туляремии на различных стадиях заболевания или бактерионосительства, когда использование других методов (посев, бактериоскопия) не дает положительного результата. При биологическом исследовании ММ (кроме трупов и зверьков с патолого-анатомическими изменениями) применяют групповое исследование, т. е. объединение органов нескольких зверьков (5—10) одного вида и пойманных в одном месте. Используют кусочки селезенки, печени, почек, лимфатические узлы, костный мозг. При групповом анализе посевы и мазки от каждого вскрываемого зверька не делают. Отобранные органы помещают в стерильную ступку, тщательно растирают пестиком, добавляют стерильный 0,9 %-й раствор натрия хлорида (NaCl) и смешивают в гомогенную суспензию. Количество раствора колеблется от 0,5 до 5,0 мл в зависимости от величины органов. Сразу после приготовления 0,2—0,5 мл взвеси набирают в шприц через небольшой кусочек стерильной ваты и вводят белой мыши под кожу паховой области правой ноги (морской свинке можно ввести до 2 мл взвеси). При вскрытии смену инструментов производят после группы зверьков, входящих в общий анализ. Органы животных, у которых на вскрытии обнаружены патолого-анатомические изменения, исследуют индивидуально. В этом случае применяют дополнительно посев и бактериоскопию (люминесцентную микроскопию). Бактериоскопия, как правило, дает положительный результат только в септической (терминальной) фазе заболевания.

Животных, добытых живыми, исследуют на наличие туляремийных антител, для чего используют сыворотку крови или «смывы» из грудной полости. Для забора крови живых грызунов умерщвляют, вскрывают грудную клетку и берут из правого желудочка сердца еще не свернувшуюся кровь (обычно от 0,5 до 3,0 мл в зависимости от вида животного). Кроме того, кровь можно брать из кончика хвоста или уха, не убивая животное, что позволяет при необходимости повторить исследование. При этом используют индивидуальные пипетки и шприцы. Отстоявшуюся сыворотку консервируют мертиолатом натрия до конечной концентрации 1 : 10 000 (на 1 мл сыворотки добавляют 2 капли по 0,05 мл раствора мертиолата натрия 1 : 1 000) с последующим прогреванием при температуре 56 °С в течение 30 мин. Можно использовать плазму крови животных (особенно мелких видов). Для этого кровь берут из сердца или периферических

сосудов и помещают в количестве 0,1 мл в лунку пластины, содержащей 0,2 мл 5 %-го раствора натрия лимонно-кислого. Через 2 ч плазму крови можно использовать в серологических реакциях микрообъемным способом с соблюдением правил биологической безопасности. Исходное разведение плазмы приравнивается к разведению сыворотки 1 : 5.

При исследовании ММ, добытых орудиями лова или павших, готовят суспензию из сгустков крови сердца и околосердечного пучка сосудов («смыв»). Суспензию готовят непосредственно в грудной полости грызунов после взятия материала для бактериологического исследования. Для этого целиком удаляют легкие, ножницами иссекают сердце, аорту и другие крупные сосуды. Шприцем с толстой иглой или пастеровской пипеткой вливают в грудную полость 0,9 %-й раствор натрия хлорида с мертиолатом натрия 1 : 4 000 в количестве 1 мл. После перемешивания взвесь отсасывают и переносят в пробирку, в которую добавляют еще 2 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида и прогревают при температуре 56 °С в течение 30 мин. «Смывы» отстаивают 1—2 ч, отсасывают надосадочную жидкость. Условно «смыв» приравнивают к разведению сыворотки 1 : 10. «Смывы», как правило, исследуют в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) и методом ПЦР.

Возможно производить забор сыворотки и цельной крови на фильтровальную бумагу, предварительно обработанную мертиолатом натрия в разведении 1 : 1 000.

Подготовка ПП и ПХМ к исследованию. Каждую погадку или пробу помета рекомендуется исследовать индивидуально. После доставки в лабораторию материал просушивают при комнатной температуре и взвешивают каждую пробу с точностью до 0,1 г. Это позволяет в дальнейшем придерживаться сравнимого исходного разведения суспензии (по сухому весу). Например, если к образцу весом 1 г добавить 4 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида, то получим разведение 1 : 5, а при добавлении 9 мл – 1 : 10 и т. д. После взвешивания дальнейшую обработку материала можно проводить двумя способами.

Первый способ – взвешенный образец помещают в специальный пакетик из тонкой полиэтиленовой пленки. Размер пакетика определяется величиной исследуемого материала. После помещения в пакетик исследуемого образца верхний край его перегибают и сшивают скрепочной машинкой. Затем шприцем непрерывного действия через прокол верхнего края пакета в него вводят подогретый (до 70 °С) 0,9 %-й раствор натрия хлорида в необходимом количестве. Использование подогретого раствора в 1—2 раза повышает титр реакции в сравнении с холодным раствором. Содержимое пакета разминают в однородную массу и через 20—30 мин отжимают в пробирку, отрезав нижний заостренный край пакета. Суспензию обеззараживают в соответствии с п. 2.8.16 санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.1285—03 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)», после чего адсорбируют взвесью 50 %-х формалинизированных эритроцитов (2 капли эритроцитов на 1 мл суспензии). Через 20—30 мин суспензию центрифугируют 10—15 мин при 2 000 об/мин или отстаивают в течение 18—20 ч в холодильнике. Полученную прозрачную надосадочную жидкость используют для постановки серологической реакции. Процедура истощения суспензии формалинизированными эритроцитами необходима для избежания неспецифических реакций.

Второй способ – при отсутствии полиэтиленовых мешочков или центрифуги суспензию можно подготовить к исследованию другим, более трудоемким способом. Погадку (или помет) растирают пестиком в фарфоровой ступке с необходимым количеством подогретого до 70 °С 0,9 %-го раствора натрия хлорида. Полученную взвесь отсасывают через кусок стерильной ваты пастеровской пипеткой, переносят в пробирку и

обеззараживают в соответствии с п. 2.8.16 санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.1285—03 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)». Затем суспензию фильтруют на стеклянной воронке с асбестовым фильтром до получения прозрачной жидкости, которую используют в реакции. Такой фильтрат, как правило, не дает неспецифических реакций даже в начальных разведениях, поэтому дополнительная обработка формалинизированными эритроцитами не требуется.

Обнаружение туляремийного антигена и/или ДНК возбудителя в исследуемом материале служит достоверным критерием наличия эпизоотии на обследуемой территории в настоящее время или в недавнем прошлом и является основанием для организации работ, направленных на выделение возбудителя. Количество положительных ПП и ПХМ позволяет судить об интенсивности эпизоотического процесса: в местах разлитых эпизоотий этот показатель составляет 20—60 % от всего материала, а при локальных (вялых) эпизоотиях – 0,5—3,0 %. Для обнаружения антигена при вяло текущих эпизоотиях туляремии необходимо собрать и исследовать не менее 100 ПП или ПХМ из одного места в течение одного сезона обследования, а для контроля за эпизоотической ситуацией в известных очагах туляремии – не менее 25 ПП и ПХМ. ПП и ПХМ, собранные весной в лесной и лесостепной зонах, характеризуют эпизоотическое состояние зимнего периода и ранней весны, а собранные осенью – лета. Видовой состав ММ, вовлеченных в эпизоотический процесс, в лабораторных условиях удается определить до вида (или рода) по хорошо сохраняющимся костным остаткам (фрагментам черепа и зубам) при сравнении с эталонной коллекцией костей скелета и зубов ММ, обитающих на данной территории.

Добытых в природе насекомых и других беспозвоночных животных исследуют, как правило, в день доставки в лабораторию или не позднее следующего дня. Исключение может быть только для взрослых иксодовых клещей, которых можно сохранять живыми 2—3 недели на холоде. Погибшие и высохшие членистоногие непригодны для бактериологического исследования.

Беспозвоночных животных перед исследованием определяют до вида (или рода) и группируют в отдельные пробы, содержащие животных одного вида (рода) и добытых из одного места. Обнаружение туляремийного микроба в организме беспозвоночных наиболее эффективно при использовании биологического метода или ПЦР-анализа, выявляющего специфическую ДНК возбудителя туляремии. В редких случаях удается обнаружить туляремийные бактерии в иксодовых клещах посевом содержимого их тела на питательную среду или с помощью люминесцентной микроскопии.

Перед исследованием взрослых иксодовых клещей (~50 особей в один анализ) помещают в пробирку, приливают 10—15 мл этилового спирта, энергичным встряхиванием промывают клещей 0,5—1,0 мин, сливают спирт, после чего 3—4 раза таким же образом промывают их в стерильной дистиллированной воде. Отмытых клещей помещают на фильтровальную бумагу для удаления излишней влаги, а затем – в ступку. Клещей раздавливают пестиком и растирают в кашицу, избегая разбрызгивания. К растертой массе добавляют 5 мл стерильного 0,9 %-го раствора натрия хлорида и тщательно перемешивают в однородную суспензию, которую набирают в шприц через небольшой кусочек стерильной ваты и вводят биопробному животному.

При исследовании личинок и нимф иксодовых клещей промывание в спирте не проводят, т. к. это может повредить анализу. Личинок объединяют по 100—200 экз., нимф – по 50—100 в зависимости от степени их упитанности. Затем помещают в стерильную ступку, растирают пестиком, добавляют 1—3 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида, тщательно перемешивают и полученную суспензию вводят биопробному животному.

Блох, гамазовых клещей, вшей сортируют по видам (родам), а также видам зверьков, с которых они были собраны, помещают в стерильные пробирки и далее подвергают обработке по той же методике, что личинок и нимф иксодовых клещей.

Кровососущих двукрылых насекомых усыпляют парами эфира для ограничения подвижности. У слепней предварительно отстригают ноги и крылья, комаров и мошек исследуют целиком. В один анализ включают 25—50 слепней или 100 комаров, или 250 мошек. Насекомых растирают в ступке, добавляют 5 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида, полученную суспензию вводят биопробному животному.

Гидробионтов – ручейников, бокоплавов, дафний, циклопов и других перед исследованием промывают в нескольких порциях воды и 1—2-х порциях стерильной дистиллированной воды. У животных, имеющих чехлики или раковинки, последние по возможности удаляют. Животных объединяют в группы по 5—10—50 экз. в зависимости от размеров особей отдельных видов, растирают в ступке, добавляют 2—5 мл 0,9 %-го раствора натрия хлорида и полученную суспензию вводят биопробному животному.

Исследование объектов внешней среды является эффективным способом обнаружения возбудителя туляремии, т. к. последний проявляет значительную устойчивость во внешней среде, особенно при низкой температуре.

Пробы воды берут из различных водоемов: речек, ручьев, прудов, озер, болот, колодцев и т. п. Из каждой точки желательно брать 2 пробы. Пробы берутся в затененном месте, на глубине 10—20 см от поверхности стоячей или слабопроточной воды. Желательно отбирать пробы в местах обитания зверьков (возле кормовых столиков, нор, хаток бобров или ондатр). В стерильные бутылочки емкостью 200—250 мл отбирают 100—200 мл воды, закрывают пробкой, бумажным колпачком и обвязывают шпагатом. Бутылочки с водой помещают в клеенчатые или полиэтиленовые мешки, упаковывают в металлический ящик и доставляют в лабораторию. В зимнее время пробы берут в прорубях, незамерзающих местах ручьев, мелиоративных каналов, рыболовных лунках. При глубоком промерзании водоема со дна берут лед или ил. После взятия каждой пробы руки (перчатки) и инвентарь обрабатывают 70°-м спиртом. Исследование воды проводят биологическим методом в день ее доставки в лабораторию. Для концентрирования возбудителя используют фильтрование, цетрифугирование, магнитные сорбенты и другие приемы. После этого белой мыши вводят подкожно до 1 мл, а морской свинке до 5 мл воды (желательно по 2 биопробы). Наиболее эффективно применение исследования воды в пойменно-болотных очагах туляремии в зимнее время.

С зерна, соломы, гнездового материала и других субстратов делают смыв 0,9 %-м раствором хлористого натрия. Для этого 5—10 г исследуемого субстрата помещают в стерильный сосуд, заливают двойным по весу количеством раствора и тщательно встряхивают. Смыв набирают в шприц (через кусочек ваты) и вводят биопробному животному. Зимой с соломы ометов собирают замерзшую мочу, экскремент грызунов, которые также используют для биопробы. Подснежные гнезда грызунов исследуют биологическим и серологическим методами.

Домашние животные (крупный рогатый скот, свиньи, овцы, северные олени) относятся к видам, малочувствительным к туляремии (3-я группа). При их исследовании используют главным образом серологические методы (реакцию агглютинации – РА и РНГА – синоним РПГА), реже – внутрикожную пробу с тулярином. Посевы из органов или биологические пробы применяют только при обследовании павших, забитых или больных животных. Исследуют в первую очередь лимфатические узлы и селезенку. При серологическом исследовании следует учитывать возможность обнаружения перекрестных реакций с бруцеллами и микробной флорой кишечника животных. Целесообразно исследовать сыворотки домашних животных, по крайней мере, в двух серологи-

ческих реакциях: РА и РНГА, считая диагностически значимыми титры в РА – 1 : 40 и выше и в РНГА – 1 : 160 и выше. Положительные реакции в РНГА следует контролировать в реакции торможения гемагглютинации (РТНГА). Обнаружение специфических антител у домашних животных имеет ориентировочное значение и служит сигналом для проведения на данной территории детальных эпизоотологических исследований на туляремию.

4.4.2. Методы лабораторного исследования

В практике эпизоотологического исследования на туляремию основное место принадлежит бактериологическим методам, обеспечивающим выявление и выделение возбудителя туляремии. Вместе с тем, существенную роль приобретают серологические методы исследования, позволяющие с меньшими трудозатратами и в короткий срок дать заключение об эпизоотическом состоянии территории. В последние годы разработан и находит применение высокочувствительный метод ПЦР, позволяющий по обнаружению специфической ДНК судить о наличии возбудителя туляремии в пробе и выявлять «некультивируемые» формы микроорганизма.

Бактериоскопия. Ввиду очень мелких размеров туляремийный микроб может быть достоверно обнаружен в окрашенных мазках-отпечатках только из обильно обсемененного патологического материала. Четко положительные результаты получают при содержании в 1 г ткани более 1 млрд микробов. Поэтому бактериоскопия эффективна при исследовании павших диких или биопробных животных, но обычно безуспешна при исследовании убитых на ранних стадиях заболевания зверьков. Метод не используется также при исследовании воды, смывов с объектов внешней среды, где концентрация возбудителя может быть незначительной.

Мазок-отпечаток делают, прикладывая к обезжиренному стеклу поверхность свежего среза исследуемого органа – лимфатического узла, селезенки, печени, а также мазок крови из сердца. Препарат хорошо просушивают, после чего 15—20 мин фиксируют в 96°-м этиловом спирте или смеси Никифорова (этиловый спирт и серный эфир в равных пропорциях). После фиксации мазок окрашивают по Романовскому-Гимзе. Раствор краски готовят из расчета 3—4 капли на 1 мл дистиллированной воды (pH 7,0—7,2). Окраска продолжается не менее 1 ч (можно до 24 ч). В правильно окрашенном мазке бактерии туляремии имеют сиреневый цвет и легко определяются по размерам, форме и тенденции к кучечному расположению.

С целью ускоренной окраски мазков применяют метод, основанный на одновременной фиксации и окраске мазка. Для этого краску Романовского-Гимзы смешивают в равных частях с метиловым спиртом (или химически чистым ацетоном). Смесь можно длительно хранить в посуде с притертой стеклянной пробкой. На свежий (не более двух суток), высушенный и нефиксированный мазок наносят 20 капель смеси. Через минуту к краске приливают 10 мл дистиллированной воды (pH 7,2). Осторожным покачиванием краску смешивают с водой. Через 10—15 мин краску сливают, мазок промывают дистиллированной водой, высушивают и просматривают под микроскопом. Бактерии туляремии окрашиваются в темно-фиолетовый цвет и четко дифференцируются от светло-сиреневого окружающего фона. Количество бактерий, обнаруженных в мазках-отпечатках из органов и крови, учитывают по 4-балльной шкале. Достоверным для диагностики является обнаружение туляремийных бактерий в количестве, оцениваемом в три или четыре балла (большое количество крупных, средних и небольших по величине скоплений бактерий в каждом поле зрения).

Люминесцентная микроскопия. В основе метода лежит реакция иммунофлуоресценции (РИФ) в ее прямом варианте. Люминесцентная микроскопия является эф-

фективным методом обнаружения возбудителя туляремии, позволяющим выявлять как живые, так и мертвые туляремийные бактерии при концентрации 1 млн м.к. в 1 мл. При меньших концентрациях – 100 тыс., 10 тыс. и 1 тыс. м.к. – в 1 мл возбудитель может быть обнаружен, но его выявление не носит закономерного характера. Реакция иммунофлуоресценции позволяет обнаружить туляремийные бактерии при отрицательном результате световой бактериоскопии. Объектами исследования в РИФ могут служить бактериальные взвеси, отпечатки органов и тканей животных, гомогенаты органов животных, беспозвоночных переносчиков. Метод используют для выявления возбудителя в органах павших и убитых биопробных животных, в трупах диких животных, органах отловленных диких животных. Метод прост в постановке, не имеет себе равного в быстроте получаемого ответа (1,5—2,0 ч) и рекомендуется для ускоренного выявления и идентификации возбудителя туляремии. При приготовлении препаратов для РИФ на обезжиренном предметном стекле делают мазки-отпечатки из лимфатического узла, селезенки, печени, легкого или гомогенатов исследуемых органов. В последнем случае используют суспензию, приготовленную для биологической пробы или серологического исследования, делая по возможности тонкий мазок. Дальнейшие процедуры постановки РИФ и учета ее результатов проводят в соответствии с инструкцией по применению иммуноглобулинов диагностических флюоресцирующих туляремийных сухих.

Бактериологический метод. Посев на питательные среды применяют для выделения культуры возбудителя туляремии из органов павших или забитых диких животных, павших или убитых лабораторных животных, а также зверьков, у которых обнаружены патолого-анатомические изменения, характерные для туляремии. Иксодовых клещей, воду, почву, смывы с объектов внешней среды не исследуют посевом ввиду их загрязнения посторонней микрофлорой.

Возбудитель туляремии не растет на обычных питательных средах (мясопептонном агаре и бульоне), что служит одним из признаков при идентификации культуры. Наиболее практичной и обычно применяемой средой для выделения и культивирования туляремийного микроба является свернутая желточная среда.

Посевы могут быть произведены методом отпечатков кусочками органа или путем тщательного втирания кусочка органа по всей поверхности среды. При обильном засеве на свернутой желточной среде сплошной рост туляремийных бактерий проявляется уже через 18—24 ч инкубирования при 37 °С; при засеве малым количеством бактерий отдельные колонии становятся заметными на 3—5 сутки и позднее. Посевы следует выдерживать в термостате до 10—12 суток. По внешнему виду рост туляремийных бактерий на свернутой желточной среде хорошо отличается от большинства других бактерий, имеет вид извилистого, слегка блестящего (не сухого), почти бесцветного нежного налета.

Для выделения и культивирования туляремийного микроба используют также агаровую среду с добавлением желтка. Среду готовят на основе сухого питательного агара: на 100 мл стерильного расплавленного и охлажденного до 45 °С агара добавляют 5 мл куриного желтка с 0,9 %-м раствором натрия хлорида (в соотношении 3 : 2).

Для культивирования туляремийных бактерий применяются различные варианты агаровых сред лабораторного изготовления на рыбных, мясных, дрожжевых основах с обязательным добавлением цистина (цистеина) 0,1 %; глюкозы 1,0 %; дрожжевого экстракта (источник витамина В). Чувствительность указанных агаровых сред можно повысить добавлением дефибринированной кроличьей или лошадиной крови (5—10 %).

На свежей агаровой среде приживаются единичные бактерии, при этом формируются колонии, которые становятся заметными через 2—3 суток инкубации, редко – в более отдаленные сроки. Посевы следует выдерживать при 37 °С до 10—12 суток. При

посеве взвеси из растертых тканей животного высокоэффективные агаровые среды позволяют обнаруживать единичные бактерии и не уступают биологической пробе. При исследовании трупов животных в первую очередь производят посев из селезенки, печени, лимфатического узла. При посеве из недостаточно свежих органов животных полезно использовать селективные добавки (СД). В качестве СД можно применять пенициллин (100 ед/мл), ампициллин (100 ед/мл), полимиксин (50—100 мкг/мл), кефзол (или цефалексин), амфотерицин В (или амфоглюкамин), ристомицин сульфат и некоторые другие.

Свернутая желточная среда Мак-Коя. Среду готовят из желтков куриных яиц, которые тщательно моют, протирают спиртом, обжигают на пламени горелки, разбивают, сливают желтки, отделяя их от белка, в стерильный градуированный сосуд, смешивают с 0,9 %-м раствором натрия хлорида (pH 7,0—7,2) в соотношении: 60 % желтка и 40 % раствора хлористого натрия. Жидкую среду разливают в пробирки по 4—5 мл и помещают в аппарат для свертывания сывороток при наклонном положении пробирок, чем достигают скашивания среды. Свертывание среды производят при 80 °С в течение 1 ч. Среду сохраняют при 4—6 °С, предохраняя от высыхания. Правильно приготовленная среда должна иметь на дне пробирки конденсационную жидкость. Приготовленную среду можно использовать в течение 1 месяца. При необходимости в среду добавляют СД.

Кровяная среда Емельяновой. Среду готовят на рыбно-дрожжевом гидролизате. К 100 мл дистиллированной воды добавляют 20 мл гидролизата свежей рыбы, 10 мл гидролизата желатины, 2,5 мл аутолизата дрожжей, 0,5 г хлорида натрия, 1 г глюкозы, 0,1 г цистина (цистеина), 1,5—2,5 г агара (в зависимости от его качества); pH среды 7,0—7,2. После стерилизации в расплавленную и охлажденную до 45 °С среду добавляют 10 мл свежей кроличьей или лошадиной дефибринированной крови, разливают в пробирки (или чашки) и скашивают. Правильно приготовленная кровяная среда хранится при 4—6 °С в течение 1 месяца. Однако в процессе хранения чувствительность среды постепенно снижается. При необходимости в среду одновременно с кровью добавляют (СД).

Разработаны и используются на практике питательные сухие агаровые среды для культивирования и выделения туляремийного микроба, содержащие все необходимые факторы роста и не требующие добавления крови (или желтка): питательная среда элективная для выделения возбудителя туляремии сухая (АДЭТ); питательная среда культивирования и выделения туляремийного микроба (FT); основа питательной среды для культивирования туляремийного микроба сухая и другие, разрешенные к применению для этих целей в установленном порядке.

Биологический метод. Биологическая проба является самым эффективным способом обнаружения туляремийных бактерий в любом исследуемом материале. Биологическим методом можно исследовать органы павших или убитых диких млекопитающих, кровососущих членистоногих, гидробионтов, воду, смывы с различных субстратов, т. е. материалы, где могут содержаться живые туляремийные бактерии. Для биологической пробы обычно используют белых мышей, которые заболевают и гибнут от туляремии при подкожном введении суспензии, содержащей единичные бактерии. При массивном инфицировании исследуемых объектов мыши погибают уже на 3—4 сутки; при меньшей обсемененности материала гибель животных может затянуться до 7—9 суток, иногда до 15—20 суток. В большинстве случаев животные погибают от туляремии с характерными патолого-анатомическими изменениями: обнаруживаются воспалительные изменения ткани на месте заражения (плотный инфильтрат), увеличение, уплотнение и гиперемия лимфатических узлов, особенно близлежащих к месту заражения, резкая гиперемия со-

судов подкожной клетчатки, уплотнение и увеличение селезенки, печени, увеличение и гиперемия надпочечников, гиперемия тонкого кишечника. В мазках-отпечатках из селезенки, печени и крови (при окраске по Романовскому-Гимзе или путем люминесцентной микроскопии) обнаруживают большое количество туляремийных бактерий, а в посеве на специальные питательные среды селезенки и печени уже через 18—24 ч появляется рост культуры возбудителя туляремии. Для биологической пробы могут быть использованы и морские свинки, обладающие такой же высокой чувствительностью к туляремии, как и белые мыши, а также дикие грызуны 1-й группы (обыкновенные полевки, домовые мыши), отловленные на неэпизоотических территориях и выдержанные в карантине 30 суток. Биопробных животных содержат поодиночке. При гибели биопробных животных или обнаружении у забитых характерных для туляремии патолого-анатомических изменений осуществляют следующий пассаж через белую мышь (подкожным или накожным методами). Биопробных животных выдерживают: белых мышей до 15—21 суток, морских свинок – до 25 суток, после чего забивают.

Иммуносерологические методы исследования. Возможность исследования материала, не пригодного для бактериологического исследования, делает серологические методы в ряде случаев основным методическим приемом, позволяющим выявить туляремийные эпизоотии.

Все найденные трупы грызунов подлежат обязательному серологическому исследованию на наличие туляремийного антигена параллельно с биологическим и бактериологическим исследованием, включая люминесцентную микроскопию. Серологические методы особенно эффективны при поисках антигена в ПП, ПХМ, субстратах гнезд и других объектах внешней среды.

При исследовании трупов диких или лабораторных животных готовят суспензию из кусочков органов животных (селезенка, печень) путем растирания их в ступке с добавлением 0,9 %-го раствора натрия хлорида из расчета 1 : 5 или 1 : 10. Полученную суспензию обеззараживают в соответствии с п. 2.8.16 СП 1.3.1285—03 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)», фильтруют (лучше через асбестовую вату) для получения относительно прозрачного фильтрата. Можно использовать остатки суспензии из органов, приготовленных для постановки биологической пробы.

Для исследования субстрата гнезда грызунов желательно брать его целиком вместе с прилегающими слоями почвы. Материал заливают 0,9 %-м раствором натрия хлорида с избытком (примерно 10 мл). Через 1—6 ч надосадочную жидкость отсасывают, обеззараживают в соответствии с п. 2.8.16 СП 1.3.1285—03 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)», фильтруют и используют в серологических реакциях.

Для серологического исследования бактериальной культуры последнюю выращивают 2 суток при 37 °С на желточной или агаровой среде, готовят взвесь на физиологическом растворе (pH 7,0—7,2) с концентрацией 1×10^9 м.к./мл по оптическому стандарту мутности, обеззараживают в соответствии с п. 2.8.16 СП 1.3.1285—03 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)». Взвесь разводят в 10 раз до концентрации 100 млн м.к./мл и используют в серологических реакциях.

Наиболее эффективной и специфичной серологической реакцией для выявления туляремийного антигена при исследовании органов животных, ПП, ПХМ, субстрата гнезд, почвы и тому подобного является реакция нейтрализации антител (РНАт) с туляремийным антигенным эритроцитарным диагностикумом. При массовых исследованиях ПП, ПХМ, других объектов внешней среды за диагностический титр принимают

разведение фильтрата 1 : 20 и выше. Реакции в более низких титрах расценивают как сомнительные. При исследовании некоторых объектов (бактериальные суспензии, органы животных и др.) помимо РНАт можно применять иммуноферментный анализ (ИФА), реакцию объемной агломерации (РОА), реакцию коагглютинации (РК) и некоторые другие методы, с успехом используемые в отдельных регионах и учреждениях.

Иммуноферментный анализ на твердофазном носителе (ИФА) используется для выявления туляремийного антигена в различных объектах: органы животных, ПП, ПХМ, другие объекты внешней среды, а также для идентификации выделенных культур возбудителя туляремии. Метод характеризуется высокой чувствительностью, специфичностью, возможностью количественной и автоматизированной оценки результатов, воспроизводимостью и стандартностью основных ингредиентов анализа. С помощью ИФА возможно обнаружение $n \times 10^3$—$n \times 10^4$ туляремийных бактерий в 1 мл или 1—5 нг/мл туляремийного антигена.

Для постановки ИФА используют диагностическую иммуноферментную тест-систему для определения туляремийного антигена.

Наиболее эффективными и доступными методами выявления антител являются реакция агглютинации (РА) и реакция непрямой гемагглютинации (РНГА). Титры антител у переболевших диких животных колеблются в пределах 1 : 10 – 1 : 320, редко выше, в зависимости от давности заболевания. У сельскохозяйственных животных они могут достигать 1 : 320 – 1 : 640, но чаще бывают низкими. Наличие антител у животных указывает на контакт животного с возбудителем туляремии и наличие эпизоотии. Для выявления антител у животных могут быть использованы сыворотка, плазма или «смывы» из грудной полости.

Исследование методом ПЦР. В ряде случаев для определения ДНК возбудителя туляремии в различных объектах применяется ПЦР. Метод превышает по чувствительности серологические тесты и используется для индикации и ускоренной диагностики туляремии. Подготовку материала и проведение реакции осуществляют в соответствии с МУ 1.3.1794—03 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I—II групп патогенности» и инструкцией по применению препарата с использованием ПЦР-тест-системы для выявления ДНК возбудителя туляремии.

4.4.3. Идентификация возбудителя туляремии

Идентификацию осуществляют на основании совокупности следующих признаков:

- морфологии и окраски бактерий в мазках и специфического свечения в РИФ;
- характера роста на свернутой желточной среде;
- отсутствия роста на простых питательных средах;
- агглютинации специфической туляремийной сывороткой;
- патогенности для белых мышей и морских свинок.

Выделенная культура должна иметь характерный для микроба туляремии рост на свернутой желточной среде в виде извилистого, слегка блестящего (не сухого) почти бесцветного налета не очень сильно выраженной слизистой консистенции, хорошо снимающегося петлей. Культура легко суспендируется. Для изучения морфологии и тинкториальных свойств готовят мазок на предметном стекле, который фиксируют и окрашивают по Граму. В мазке возбудитель туляремии представляет собой мелкую, грамотрицательную коккобактерию. В окрашенных мазках из культуры с плотной среды обнаруживается обильная слизь. Присутствие в мазке окрашенной слизи весьма характерно для возбудителя туляремии. Для проверки отсутствия роста на простых питательных средах используют слабощелочной питательный агар и бульон.

Антигенную специфичность выделенной культуры проверяют с помощью реакции агглютинации с лошадиной (коммерческой) агглютинирующей сывороткой. Для этого испытуемую культуру выращивают в течение 2 суток при 37 °С на свернутой желточной среде в количестве 2—3 пробирок. Чистоту посева контролируют бактериоскопией. Реакцию агглютинации (РА) ставят общепринятым способом в пробирках. В качестве антигена используют живую испытуемую культуру, суспендированную в 0,9 %- м растворе натрия хлорида (рН 7,0—7,2) до концентрации 1×10^9 м.к./мл по оптическому стандарту мутности 10 единиц (ОСО 42-28-86П). После добавления антигена к разведениям сыворотки пробирки выдерживают 2 ч при 37 °С, затем 12—18 ч при комнатной температуре, после чего проводят учет результатов. Культура должна агглютинироваться до титров, указанных в инструкции по применению препарата. При этом должна иметь место четкая реакция, сопровождающаяся полным просветлением жидкости и выпадением на дно пробирки плотного агглютината. При встряхивании пробирки агглютинат разбивается на крупные хлопья, а жидкость остается прозрачной. Специфичность выделенной культуры может быть подтверждена также с помощью РИФ. При обработке культуры туляремийной люминесцирующей сывороткой обнаруживают специфическое яркое зелено-желтое свечение бактерий.

При возможности проводят проверку вирулентности выделенных культур, но не позднее месячного срока после их выделения. Ориентировочное определение вирулентности проводят, как правило, на одном из двух видов животных (белые мыши или морские свинки). Для заражения используют 2 дозы: 1 и 10 м.к. по 2—3 животных на каждую дозу. Свежевыделенные туляремийные культуры при подкожном введении вызывают гибель белых мышей (морских свинок) при дозе 1 м.к. с обнаружением характерных для туляремии изменений в органах и выделением чистой культуры. При необходимости определяют LD_{50} для лабораторных животных.

На территории Российской Федерации циркулируют и выделяются культуры голарктического подвида возбудителя туляремии F. tularensis subspecies holarctica, различающиеся по чувствительности к эритромицину (и другим макролидам). Для определения этого свойства используют диски с эритромицином, содержащие 15 мкг антибиотика. Эта концентрация антибиотика позволяет дифференцировать штаммы туляремийного микроба на два биологических варианта: биовар I Ery(s) и биовар II Ery(r). Для определения принадлежности к тому или иному биовару готовят суспензию испытуемой культуры в концентрации 1×10^9 м.кл./мл по оптическому стандарту мутности 10 единиц (ОСО 42-28-86П). Вносят 0,5 мл такой суспензии на чашку с агаровой средой, равномерно распределяя по поверхности, после чего накладывают в центральную часть чашки диск с эритромицином. Чашку помещают в термостат при 37 °С. Учет и оценку результатов производят через 1—2 суток. При посеве чувствительной к эритромицину культуры вокруг диска с антибиотиком обнаруживают выраженную зону задержки роста диаметром 2—3 см; при посеве культуры, резистентной к эритромицину, по всей поверхности чашки отмечается равномерный рост.

5. Лабораторная диагностика туляремии у людей

Лабораторная диагностика туляремии у людей основывается на иммунологических (сероаллергическая диагностика) и бактериологических методах.

5.1. Аллергические и серологические методы

Аллергические и серологические методы играют основную роль в лабораторной диагностике туляремии.

В патогенезе туляремийной инфекции значительную роль играет развитие гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), выявление которой может служить методом аллергической диагностики туляремии. Метод основан на особенностях организма человека, заболевшего или переболевшего туляремией, отвечать местной аллергической реакцией в виде гиперемии и инфильтрата на введение туляремийного антигена (тулярина). У больных туляремией людей кожная аллергическая реакция становится положительной обычно с 3—5 суток болезни, реже – в более поздние сроки, и сохраняется многие годы, благодаря чему аллергический метод служит для ранней или ретроспективной диагностики, являясь при этом строго специфичным. У привитых живой вакциной также возникает аллергическая реактивность, но она развивается медленнее (через 10—15 дней после вакцинации). Аллергический ответ у вакцинированных сохраняется 5—6 лет, иногда дольше, и может служить методом определения сохранности поствакцинального иммунитета. Кожную аллергическую реакцию выполняют как накожно, так и внутрикожно с соответствующим тулярином. Следует помнить, что аллергическая реакция на введение антигена – это общая реакция организма, которая при развившемся инфекционном процессе может вызвать ухудшение состояния больного, а местная реакция иногда сопровождается некрозом. Поэтому в качестве диагностического приема у больных людей пробу с тулярином применяют с осторожностью.

Для внутрикожной пробы применяют внутрикожный тулярин – взвесь туляремийных бактерий вакцинного штамма, убитых нагреванием при 70 °С в течение 1 ч. Взвесь готовят на 0,9 %-м растворе натрия хлорида, содержащем 3 % глицерина. В 1 мл препарата содержится 500 млн убитых бактерий. Выпускают препарат в запаянных ампулах, содержащих 1 мл препарата (или 10 человеко-доз). Препарат предназначен в первую очередь для диагностики туляремии.

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

Учет и оценка реакции. Учет реакции производят через 24—48 ч путем осмотра и ощупывания участка кожи, куда был введен тулярин. При положительной реакции на месте введения тулярина уже через 6—10 ч обнаруживаются покраснение (гиперемия) и отек (инфильтрат). Через 24 ч реакция кожи выражена вполне отчетливо и имеет вид гиперемированного, нередко болезненного инфильтрата. Реакцию считают положительной при наличии инфильтрата и гиперемии диаметром не менее 0,5 см. Интенсивность реакции определяют по величине реагирующего участка (отека и гиперемии) кожи, который измеряют в сантиметрах в двух взаимно перпендикулярных направлениях. Изменения кожи в виде гиперемии без инфильтрата, исчезающие через 48 ч, расценивают как отрицательный результат. В сомнительных и подозрительных случаях возможна повторная постановка реакции, т. к. отрицательный результат мог быть обусловлен ранним сроком от начала заболевания. Так, аллергическая реакция может запаздывать при тяжелых формах инфекции. Запаздывание реакции может также иметь место при раннем применении антибиотиков для лечения больного. В ряде случаев аллергическая реакция сопровождается образованием пустулы или кратковременным лимфангоитом с незначительным увеличением регионарных лимфатических узлов и повышением температуры тела на 1,0—1,5 °С в течение 1—2 дней. Известны редкие случаи образования некроза на месте инъекции тулярина. В этой связи для диагностики туляремии предпочтительнее использовать аллергические методы in vitro или серологические методы.

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

в 0,9 %-м растворе натрия хлорида, содержащем 3 % глицерина. В 1 мл препарата содержится 10 млрд убитых бактерий. Выпускают препарат в запаянных ампулах, содержащих 1 мл, что составляет 20 человеко-доз. Препарат предназначен в первую очередь для определения иммунитета у привитых против туляремии или для ретроспективного обследования.

Перед употреблением ампулу с накожным тулярином встряхивают до образования равномерной взвеси. Одну каплю тулярина глазной пипеткой наносят на обработанную спиртом и эфиром кожу наружной поверхности левого плеча в его средней трети. Через каплю стерильным скарификатором делают две параллельные насечки длиной 8—10 мм, соблюдая расстояние между насечками 5 мм, до появления росинок крови. Затем тулярин тщательно втирают в насечки плоской стороной скарификатора в течение 1 мин. Тулярин применяют немедленно после вскрытия ампулы.

Учет и оценка реакции. Учет реакции производят через 48—72 ч. Положительная реакция выражается отечностью кожи вокруг насечек и краснотой, которые иногда появляются уже через 24 ч после введения тулярина, через 48—72 ч реакция ярко выражена и далее постепенно угасает, полностью исчезая к 7—10 дню. Диаметр реагирующего участка достигает 1—2 см. В редких случаях по ходу насечек появляются везикулы, исчезающие через 2—3 дня. Реакцию считают положительной при величине реагирующего участка кожи не менее 0,5 см и наличии вдоль насечек ясного покраснения и небольшой отечности (валик). При правильной технике постановки накожная туляриновая проба по чувствительности не уступает внутрикожной, но в отличие от последней не сопровождается повышенными местными или общими реакциями. Категорически запрещается накожный тулярин вводить внутрикожно или подкожно, т. к. он может вызвать бурную местную и общую реакции.

Реакция лейкоцитолиза (РЛ) основана на учете разрушения лейкоцитов сенсибилизированного организма под влиянием специфического аллергена (антигена), регистрируемого методом in vitro. Реакция лизиса лейкоцитов становится положительной уже в первые дни после вакцинации или заболевания (3—4 день), удерживается в течение многих лет (у переболевших – до 40 лет). На 7—15 день после вакцинации показатели лизиса лейкоцитов составляют в среднем 49—50 %, затем постепенно снижаются, но даже через 1—5 лет после вакцинации иногда остаются на достаточно высоком уровне (30—31 %). РЛ обладает строгой специфичностью, дает возможность количественного учета степени сенсибилизации организма, позволяет получить ответ через несколько часов после взятия крови.

В две лунки полистироловой пластины вносят по 50 мкл 10 %-го раствора натрия цитрата, затем в первую (опытную) лунку добавляют 50 мкл антигена (накожного тулярина, содержащего 1,10 (в степени 10) бактерий в 1 мл), а во вторую (контрольную) – 50 мкл 0,9 %-го раствора натрия хлорида. Таким образом, в обеих лунках конечная концентрация цитрата натрия составляет 5 %. Кровь для исследования берут из пальца руки и в количестве 100 мкл вносят в каждую из двух лунок. Пластинку закрывают и помещают на 2 ч в термостат при температуре 37 °С. Кровь в лунках тщательно перемешивают стеклянной палочкой. Затем по 20 мкл крови из обеих лунок поочередно забирают с помощью микропипеточного дозатора и переносят в соответствующие лунки планшета для макроагглютинации, содержащие 0,4 мл 3 %-й уксусной кислоты, подкрашенной до светло-голубого цвета с помощью метиленовой синьки.

Количество лейкоцитов подсчитывают в крови из обеих лунок в камере Горяева. Разрушенные клетки, а также клетки, собирающиеся в кучки, не учитывают. Коэффициент лейкоцитолиза вычисляют по формуле:

$$K\% = \frac{M_к - M_о}{M_к} \cdot 100, \quad \text{где}$$

$M_о$ – количество лейкоцитов в опыте (первая лунка);
$M_к$ – количество лейкоцитов в контроле (вторая лунка).

Для оценки результатов используют следующую шкалу показателей:

$K = 15\ \%$ – отрицательный или сомнительный результат;
$K = 16—20\ \%$ – слабо положительный результат;
$K = 21—30\ \%$ – положительный результат;
$K = 31\ \%$ и выше – резко положительный результат.

Реакция агглютинации (РА) служит для установления диагноза у больного или переболевшего (ретроспективный диагноз) и может быть использована при изучении иммунологического состояния привитых против туляремии. Обнаружение агглютининов у больного туляремией обычно отмечается через 10—15 дней, при этом агглютинационный титр сыворотки в этот период составляет 1 : 50—1 : 100, но далее быстро нарастает и на 4—6-й неделе болезни достигает 1 : 400—1 : 800, реже 1 : 1 600 и выше. По достижении максимальных показателей агглютинационный титр сыворотки затем медленно снижается и через 6—12 месяцев составляет 1 : 100—1 : 400, позднее падает до 1 : 10—1 : 50 и на этом уровне может удерживаться в течение многих лет. Длительность сохранения агглютининов делает возможным использование РА для ретроспективного диагноза. У привитых против туляремии агглютинины обнаруживаются через 2—3 недели, достигают через 4—6 недель максимальных титров 1 : 160—1 : 320, реже выше, затем снижаются до 1 : 10—1 : 40 и обычно выявляются в течение 5—7 лет после вакцинации (иногда дольше). В случае необходимости может быть поставлена кровянокапельная реакция, которая позволяет выдать ответ в течение 5 мин и может быть поставлена с сухой каплей крови.

Кровь для исследования у больного (или вакцинированного) берут из локтевой вены в количестве 3—5 мл (для макроагглютинации) или из пальца руки (для кровянокапельной реакции).

Антигеном для РА и кровяно-капельной реакции служит туляремийный диагностикум, представляющий собой убитую формалином взвесь туляремийных бактерий вакцинного штамма. В 1 мл препарата содержится 25 млрд туляремийных бактерий.

Обе реакции ставят в соответствии с инструкцией по применению диагностикума туляремийного жидкого для объемной и кровяно-капельной реакции агглютинации.

При серологической диагностике туляремии у человека диагностическим считается титр 1 : 100 и выше, однако обязательно должно быть прослежено его нарастание. При отрицательной или сомнительной реакции, а также при положительной реакции в низких разведениях сыворотки у подозрительных на туляремию больных рекомендуют повторить исследование сыворотки через 7—10 дней. Нарастание титра сыворотки в 2—4 и выше раза свидетельствует о свежем случае туляремии и подтверждении диагноза.

Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) является чувствительным методом серологической диагностики и используется как для ранней, так и ретроспективной диагностики, а также для определения иммунологического состояния привитых. У больных туляремией антитела обычно обнаруживаются в конце 1-й или на 2-й неделе заболевания, через 1,0—1,5 месяца титры РНГА достигают максимальных показателей (1 : 10 000—1 : 20 000, реже выше), после чего снижаются и на уровне 1 : 100—1 : 200 сохраняются длительное время.

У привитых антитела также обнаруживаются постоянно, однако в более низких титрах, не превышающих 1 : 2 000—1 : 5 000 через 1,0—1,5 месяца после вакцинации, сохраняются в течение нескольких лет на низком уровне 1 : 20—1 : 80.

Антигеном для постановки РНГА служит туляремийный эритроцитарный диагностикум (антигенный). Препарат представляет собой формалинизированные эритроциты барана, сенсибилизированные туляремийным антигеном, выпускается в жидком и сухом виде. Жидкий препарат – 10 %-я взвесь эритроцитов в растворе формалина 10 %-й концентрации. Сухой лиофилизированный препарат – высушенная в вакууме 10 %-я взвесь эритроцитов без консерванта. Перед употреблением его разводят в соответствии с указаниями на этикетке. Для постановки реакции в полистироловых пластинах оба препарата применяют в 2,5 %-й концентрации, а при постановке реакции в микрообъемах – в 0,5 %-й концентрации.

Техника постановки РНГА описана в инструкции по применению диагностикума туляремийного эритроцитарного антигенного.

РНГА при туляремии является достаточно специфичной и обнаруживает некоторые перекрестные реакции только с бруцеллезными сыворотками. Дифференциальная диагностика возможна по высоте титров в РНГА, которые значительно выше с гомологичным антигеном.

РНГА может быть выполнена в микрообъемах с помощью микротитратора типа Такачи (или круглодонных микропланшетах с микропипетками), который позволяет осуществлять титрование материала в объемах 25 и 50 мкл. Техника постановки реакций, последовательность всех операций такая же, как и при исследовании в полистироловых пластинах. Следует, однако, иметь в виду, что чувствительность микрометода обычно на одно разведение (т. е. в 2 раза) ниже, чем макрометода.

Специфичность положительного результата, полученного в РНГА, может быть проверена с помощью трехкомпонентной реакции – реакции торможения непрямой гемагглютинации (РТНГА).

Иммуноферментный анализ на твердом носителе (ИФА) используют для диагностики туляремии у больных и переболевших людей, определения иммунитета у вакцинированных против туляремии. У больных туляремией специфические антитела обнаруживаются в ИФА между 6—10 днями, достигают максимальных показателей к 4—7 неделям, затем уровень их снижается, но они продолжают длительно (более 10 лет) выявляться после перенесенного заболевания. ИФА обеспечивает более раннюю (в сравнении с РА и РНГА) и эффективную иммунологическую диагностику. Титры антител у больных и вакцинированных колеблются в значительных пределах от 1 : 400 до 1 : 40 000 и выше и, как правило, в 10—20 раз превышают таковые в РА и РНГА.

Для постановки ИФА используют диагностическую иммуноферментную тест-систему для определения туляремийных антител. Выявление туляремийных антител в сыворотках людей происходит за счет специфического взаимодействия антигена туляремийного микроба, адсорбированного на планшете, с туляремийными антителами в исследуемой сыворотке. Образовавшийся комплекс «антиген–антитело» определяют с помощью антител против иммуноглобулинов человека, меченных пероксидазой.

В соответствии с назначением тест-система представляет собой набор ингредиентов для проведения иммуноферментного анализа на твердофазном носителе и включает в себя: туляремийный липополисахарид; антитела против иммуноглобулинов человека, меченных пероксидазой; контрольную положительную сыворотку; контрольную отрицательную сыворотку; набор солей, необходимых для приготовления буферных растворов; субстрат – О-фенилендиамин (ОФД); твин-20; бычий сывороточный альбумин (БСА); планшеты для ИФА однократного применения.

Пробы рекомендуется первоначально исследовать параллельно в двух лунках в разведении 1 : 200 с последующей раститровкой положительных сывороток для определения титра антител, используя 2-кратные разведения сывороток.

При постановке ИФА предусматривают следующие контроли (на каждом планшете):

- отрицательная сыворотка в разведении 1 : 200 и выше – отсутствие окрашивания раствора;
- положительная сыворотка в разведении 1 : 200 и выше – выраженное окрашивание раствора (при инструментальной оценке ОП не менее чем в 2 раза выше ОП отрицательной сыворотки);
- контроль конъюгата (вместо сыворотки вносят раствор ФСБ-твин) – отсутствие окрашивания раствора;
- контроль субстратной смеси (вместо конъюгата вносят раствор ФСБ-твин) – отсутствие окрашивания раствора.

В сомнительных случаях для подтверждения специфичности результатов рекомендуется постановка реакции торможения специфическим антигеном. Диагностическим титром в ИФА считают разведение сыворотки 1 : 400 и выше. Более подробно методика ИФА отражена в инструкции по применению тест-системы иммуноферментной для определения туляремийных антител.

В последние годы для диагностики туляремии разработаны и некоторые другие методы, в частности основанные на использовании синтетических носителей для сенсибилизации антигена, с успехом используемые в отдельных регионах и учреждениях.

Применение непрямого иммунофлуоресцентного (ИФМ) метода для обнаружения туляремийных антител. При применении непрямого ИФМ для обнаружения антител к туляремийному микробу заранее готовят мазки из 1—2-суточной агаровой культуры возбудителя (1 млрд взвесь). При этом на одном предметном стекле делают 8 мазков, фиксируют их в этиловом спирте в течение 30 мин, не обжигая, высушивают на воздухе и помещают во влажную камеру. Исследуемую сыворотку разводят 2-кратно с разведения 1 : 10 до 1 : 640 – 1 : 1 280 и наносят пастеровской пипеткой на мазки, начиная с большего разведения. Влажную камеру с препаратом помещают в термостат (37 °С на 30 мин). Мазок отмывают от несвязавшихся антител и после подсыхания его вновь помещают во влажную камеру, докрашивая антивидовой люминесцирующей сывороткой в рабочем разведении. Дальнейшую обработку препарата ведут, как при прямом иммунолюминесцентном методе. После просмотра препарата под люминесцентным микроскопом устанавливают титр антител в исследуемой сыворотке.

В качестве контролей служат препараты, в которых туляремийные бактерии обработаны туляремийной сывороткой (положительный контроль) и сывороткой, не содержащей антитела к возбудителю туляремии (отрицательный контроль). *При исследовании сыворотки больного с подозрением на туляремию диагностическим считают титр* не менее 1 : 40.

5.2. Бактериологический метод исследования

Бактериологические методы диагностики туляремии имеют дополнительное значение и не всегда эффективны, что определяется особенностями течения инфекции у человека с малой обсемененностью органов и тканей возбудителем. Следует учитывать, что не в любом материале, взятом от больного, содержатся живые туляремийные бактерии. Кроме того, выделение возбудителя наиболее вероятно в течение первых 2—3 недель от начала заболевания и реже в более поздние сроки.

Выделение и идентификация возбудителя туляремии могут быть произведены только в лабораториях, имеющих разрешение на работу с культурой микроорганизмов I или II групп патогенности. Забор и доставку патологического материала в лабораторию производят с соблюдением предосторожностей и в соответствии с СП 1.3.1285—03 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II групп патогенности (опасности)».

Использование бактериологического метода при диагностике туляремии возможно, но, по сравнению с биологическим методом, малоэффективно, т. к. в организме больного туляремийные бактерии содержатся в малом количестве. Лишь в редких случаях удавалось высевать 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 заболевания. Для этого используют специальные среды, применяемые для культивирования туляремийного микроба, разрешенные к применению в Российской Федерации в установленном порядке. Наиболее чувствительными являются свернутая желточная среда, желточно-агаровая среда, различные варианты агаровых сред, содержащих цистин, глюкозу, кровь, другие факторы роста, а также специальные среды для культивирования туляремийного микроб (раздел настоящих методических указаний). Скорость появления роста культуры зависит от количества микробов в исследуемом материале: при посеве слабо инфицированного материала рост отдельных колоний возможен в отдаленные сроки, поэтому посевы следует выдерживать в термостате при 37 °С в течение не менее 10 суток.

5.3. Биологический метод исследования

Биологическая проба является самым чувствительным способом обнаружения туляремийных бактерий в любом исследуемом материале, в т. ч. и при исследовании материала от больных людей, т. к. биопробные животные (белые мыши, морские свинки) заболевают туляремией со смертельным исходом при подкожном введении единичных бактерий. Однако при обследовании больных людей даже биологический метод не всегда надежен, т. к. не в любом образце материала, взятом от больного, имеются жизнеспособные туляремийные бактерии. В отделяемом кожной язвы и в пунктате из пораженного лимфатического узла возбудитель туляремии может быть обнаружен в течение 3 недель от начала заболевания, редко позднее. Известны случаи выделения возбудителя из мокроты, материала, взятого из зева (с миндалин) или конъюнктивы глаза. В редких случаях удается выделить возбудитель из крови, но обычно не позднее первой декады болезни.

Патологический материал (отделяемое кожной язвы, конъюнктивы глаза, миндалин или мокроту, пунктат из бубона и др.) смешивают с небольшим количеством 0,9 %-го раствора натрия хлорида (0,3—0,5 мл) и вводят подкожно белой мыши или внутрибрюшинно морской свинке. Кровь для исследования (3—5 мл) берут из локтевой вены, разводят пополам тем же раствором и вводят подкожно белым мышам (по 0,5—1,0 мл) или внутрибрюшинно морским свинкам (5—7 мл). Сроки гибели биопробных животных зависят от степени инфицированности патологического материала и составляют 4—9 и более суток (до 15) для белых мышей и 6—15 (до 20) для морских свинок. Культуру туляремийных бактерий от биопробных животных выделяют посевом на специальные питательные среды (см. выше)

5.4. Иммунофлуоресцентный метод

При исследовании патологического материала от больных может быть эффективен прямой иммунофлуоресцентный метод, позволяющий выявлять как живые, так и

нежизнеспособные бактерии по свечению в них специфического антигена. Имеются данные, когда методом РИФ у больного туляремией через 2 месяца от начала заболевания в мазках-отпечатках из бубона были обнаружены туляремийные бактерии, тогда как выделение возбудителя бактериологическими (биологическими) методами оказалось безуспешным. В качестве объектов, подвергающихся исследованию в РИФ, могут быть мазки, приготовленные из патологического материала больного: содержимого кожного аффекта, пунктата бубона, отделяемого слизистой глаза, смывы с зева, миндалин и др.

Метод выполняется согласно инструкции по применению на препарат «Иммуноглобулины диагностические флюоресцирующие туляремийные сухие».

Учет и оценка РИФ. Мазки просматривают в падающем свете люминесцентного микроскопа с лампой ДРШ-250 и системой светофильтров. Используют иммерсионный объектив 90х (1,26) и окуляры 5х или 7х. При микроскопировании используют нефлуоресцирующее иммерсионное масло.

В положительных случаях, т. е. когда исследуемый материал содержит туляремийные бактерии, в люминесцентном микроскопе обнаруживается специфическое изумрудно-зеленое свечение туляремийных бактерий. Удается обнаружить более яркое свечение периферии бактериальной клетки и более слабое – в ее центральной части. Посторонние микроорганизмы, клетки ткани и прочие органические частицы приобретают оранжево-красную (различных оттенков) флуоресценцию. Для оценки интенсивности специфического свечения используют четырехкрестовую систему регистрации результатов. Положительным результатом считается флуоресценция, оцениваемая на ++++ или +++ при достаточном количестве (2—5 клеток в нескольких полях зрения микроскопа) специфически флуоресцирующих бактерий. При оценке исследуемого препарата необходимо учитывать не только интенсивность специфического свечения, но и обращать особое внимание на характерную морфологию бактерий и учитывать расположение клеток относительно друг друга.

При исследовании различных препаратов необходимо иметь контрольный мазок, приготовленный из взвеси туляремийных бактерий и обработанный подобно опытным образцам.

5.5. Молекулярно-генетический метод

В качестве дополнительного теста диагностики туляремии у человека может быть рекомендовано обнаружение специфической ДНК в патологическом материале методом ПЦР. Постановку и учет результатов реакции осуществляют согласно инструкции по применению препарата.

5.6. Идентификация выделенной культуры

Идентификацию свежевыделенной туляремийной культуры осуществляют на основании совокупности следующих признаков:

- морфологии клеток и грамотрицательной их окраски в мазках;
- характера роста на желточной среде или специальных средах;
- отсутствие роста на простых мясопептонных средах;
- агглютинация туляремийной сывороткой;
- специфическим свечением в реакции иммунофлуоресценции;
- способностью вызывать гибель белых мышей и морских свинок при их заражении испытуемой культурой с характерными для туляремии патолого-анатомическими изменениями в органах и выделением чистой культуры возбудителя.

5.7. Значение лабораторных исследований при диагностике туляремии

Диагноз туляремии устанавливают на основании сопоставления результатов аллергического и серологического исследований. Для серологической диагностики применяют обычно РА или РНГА. Другие серологические методы, например ИФА, применяют в сомнительных случаях и для подтверждения достоверности результатов, достигнутых другими методами (РА и РНГА). Выделение возбудителя от больного, как указано выше, не всегда эффективно и доступно только специально оснащенным лабораториям, имеющим разрешение на работу с возбудителем туляремии (II группа патогенности микроорганизмов) в установленном порядке. Кожная тулярионовая проба может служить методом ранней диагностики туляремии, т. к. становится положительной уже с 3—5 суток болезни. Однако в случаях, когда имеются противопоказания к применению накожного тулярина (повышенная сенсибилизация), прибегают к методу аллергодиагностики in vitro – реакции лейкоцитолиза. Следует иметь в виду, что методы аллергодиагностики не позволяют дифференцировать свежие случаи заболевания от анамнестических реакций, т. к. специфическая клеточная реактивность у переболевших и привитых сохраняется многие годы.

В этой связи нецелесообразно основывать диагностику туляремии только на результатах аллергических методов, а использовать и различные серологические методы диагностики. Выявление антител к туляремийному микробу при первом обследовании больного в титрах 1 : 50—1 : 100 при отсутствии нарастания титра сыворотки при последующем исследовании также не дает основания для диагноза свежего случая туляремии. Поэтому кровь больного исследуют, по крайней мере, дважды: первый раз немедленно после обращения больного за медицинской помощью и второй раз – спустя неделю после первого исследования. Если при повторном обследовании антитела не обнаружены или титр сыворотки остался без изменений, то кровь больного нужно исследовать третий раз, спустя неделю после второго обследования. Нарастание титра антител в РА и РНГА подтверждает диагноз туляремии, а его отсутствие указывает на анамнестический характер реакции.

Следует также учитывать, что раннее начало лечения больного антибиотиками (на 1-й неделе болезни) приводит к снижению титра антител. У лиц, вакцинированных против туляремии или ранее перенесших это заболевание, основанием для диагностики свежего случая туляремии может служить лишь выраженное (в 2—4 и более раза) нарастание титров антител в сыворотке, а также наличие характерных клинических проявлений заболевания.

Окончательный диагноз туляремии обеспечивают сопоставлением результатов сероаллергического обследования больного с клинико-эпидемиологическими данными.

6. Профилактика туляремии

Основу профилактики туляремии составляют вакцинация контингентов риска населения высокоэффективной живой противотуляремийной вакциной, а также профилактические мероприятия, квалифицируемые как средства и методы неспецифической профилактики.

6.1. Специфическая профилактика

Необходимость проведения профилактической вакцинации и ее объемы определяют территориальные управления (территориальные отделы территориальных управ-

лений) на основании многолетнего анализа эпизоотической и эпидемиологической обстановки на территории, энзоотичной по туляремии.

Основой профилактических мероприятий против туляремии, в первую очередь вакцинации населения, являются данные эпизоотологического и эпидемиологического обследования, а также составленные по их результатам научно обоснованные прогнозы.

6.1.1. Планирование и организация вакцинопрофилактики туляреми.

Вакцинацию против туляремии проводят населению, проживающему на энзоотичных по туляремии территориях, а также контингентам, подвергающимся риску заражения этой инфекцией. Планирование и подбор контингентов, подлежащих вакцинации против туляремии, осуществляют территориальные управления (территориальные отделы территориальных управлений) с учетом степени эпизоотической активности природных очагов, а также экономических и хозяйственных связей с сопредельными территориями.

Вакцинацию (и ревакцинацию) против туляремии проводят с применением живой туляремийной вакцины в соответствии с инструкцией по ее применению в любое время года, учитывая календарь профилактических прививок. Допускается одновременная накожная вакцинация взрослых против туляремии и бруцеллеза, туляремии и чумы на разных участках наружной поверхности средней трети плеча. Интервал между вакцинацией против туляремии и другими прививками должен быть не менее одного месяца, а в отношении детских контингентов – не менее двух месяцев. Вакцинацию осуществляют медицинские работники лечебно-профилактических учреждений.

Различают плановую и внеплановую (по эпидемиологическим показаниям) вакцинацию против туляремии.

6.1.2. Плановыми прививками охватывают население, проживающее (или работающее) на территории с наличием активных природных очагов лугополевого, степного, пойменно-болотного (и его вариантов), предгорно-ручьевого типов при 100 %-м охвате прививками лиц, за исключением детей до 7 лет и лиц, имеющих противопоказания к прививкам.

В очагах лугополевого типа не прививают детей в возрасте до 14 лет, а также лиц, не занимающихся сельскохозяйственными работами и не имеющих скота в личном пользовании, на котором могут находиться инфицированные возбудителем туляремии клещи.

В природных очагах тундрового, лесного типов, а также в пойменно-болотных очагах при отсутствии водяной полевки (где основным источником инфекции является ондатра) вакцинацию проводят только лицам с профессиональным риском инфицирования: охотникам, рыболовам (и членам их семей), пастухам, полеводам, мелиораторам, оленеводам, а также лицам, направляемым на временную работу: геологам, строителям и т. п.

На территориях с малоактивными природными очагами туляремии, а также в городах, прилегающих к природным очагам, вакцинируют только группы риска, а именно:

- работников зерно- и овощехранилищ, сахарных заводов, элеваторов, мельниц, мясокомбинатов, комбикормовых заводов, спиртозаводов, предприятий по переработке сельскохозяйственных продуктов и сырья животноводческих и птицеводческих ферм, работающих с зерном, фуражом, сахарной свеклой и другим, а также скотом, поступающим на переработку из энзоотичных по туляремии степных и лугополевых очагов;
- лиц, принимающих и обрабатывающих шкурки промысловых зверьков, поступающих из энзоотичных по туляремии территорий.

Вакцинации подлежит персонал отделов особо опасных инфекций территориальных управлений и территориальных отделов территориальных управлений, центров гигиены и эпидемиологии и филиалов центров гигиены и эпидемиологии, противочумных и научно-исследовательских учреждений, лабораторий и эпидемиологических отрядов, работающих с возбудителем туляремии или осуществляющих сбор и исследование мелких млекопитающих, членистоногих, объектов внешней среды из энзоотичных по туляремии территорий, а также подразделений учреждений, проводящих дератизационные и дезинсекционные мероприятия.

Ревакцинацию проводят через 5 лет контингентам, подлежащим плановой вакцинации.

Принимая во внимание стойкость природных очагов туляремии и их длительное существование, отмена плановых прививок допускается только на основании представленных территориальными управлениями (территориальными отделами территориальных управлений) материалов, свидетельствующих об отсутствии циркуляции возбудителя в биоценозе.

6.1.3. Внеплановую по эпидемиологическим показаниям вакцинацию против туляремии проводят:

- в населенных пунктах, расположенных на территориях, ранее считавшихся благополучными по туляремии, при выделении возбудителя туляремии из каких-либо объектов или заболевании людей (даже единичные случаи);
- в населенных пунктах, расположенных на территориях активных природных очагов туляремии, при выявлении низкой иммунной прослойки (менее 70 % в лугополевых очагах и менее 90 % в пойменно-болотных очагах);
- в городах, непосредственно прилегающих к активным природным очагам туляремии, контингентам, подвергающимся риску заражения – членам садоводческих кооперативов, владельцам (и членам их семей) личного водного и автотранспорта, работникам водного транспорта и т. п.;
- лицам, выезжающим для постоянных или временных работ на территории активных природных очагов туляремии: охотникам, лесникам, мелиораторам, геодезистам, заготовщикам шкурок промысловых зверьков (водяных полевок, зайцев, ондатр), геологам, членам научных экспедиций, лицам, направляемым на сельскохозяйственные, строительные, изыскательские или иные работы, туристам и др.

Вакцинацию вышеуказанных лиц и групп организуют и проводят организации здравоохранения в местах их формирования.

6.1.4. Контроль за состоянием противотуляремийного иммунитета.

Контроль за своевременностью и качеством вакцинации против туляремии, а также за состоянием иммунитета осуществляют территориальные управления (территориальные отделы территориальных управлений) и центры гигиены и эпидемиологии (филиалы центров гигиены и эпидемиологии). Состояние иммунитета у вакцинированных проверяют через 5 лет после вакцинации и в последующем – 1 раз в 2 года. Ревакцинацию проводят в случае отрицательных результатов иммунологических показателей (аллергические или серологические реакции).

Иммунную структуру населения определяют путем выборочной проверки взрослого работоспособного населения также с помощью аллергического (туляриновая проба) или одного из серологических методов исследования (реакция агглютинации, реакция пассивной гемагглютинации, иммуноферментный анализ). При этом предпочтительнее использовать серологические методы исследования. Общее число проверяемых людей в конкретном административном районе должно составлять не менее 1 % к общему числу проживающих (или не менее 10 % в отдельном населенном пункте). Ревак-

цинацию проводят при выявлении уровня иммунной прослойки ниже 70 % в лугополевых очагах и ниже 90 % – в пойменно-болотных очагах. Отбор контингентов для проверки иммунной структуры населения, оценки результатов иммунологических реакций осуществляют при обязательном участии специалистов территориальных управлений (территориальных отделов территориальных управлений) и (или) центров гигиены и эпидемиологии (филиалов центров гигиены и эпидемиологии): отделов особо опасных инфекций, врачей-эпидемиологов и др.

У персонала отделов особо опасных инфекций территориальных управлений (территориальных отделов территориальных управлений) и центров гигиены и эпидемиологии (филиалов центров гигиены и эпидемиологии), противочумных, научно-исследовательских учреждений, эпидемиологических отрядов, проводящих работу с возбудителем туляремии и привитых с положительным результатом, состояние иммунитета проверяют 1 раз в 2 года. К работе допускаются лица с наличием противотуляремийного иммунитета, определяемого с помощью аллергических (туляриновая проба или реакция лейкоцитолиза) или одного из серологических методов (реакция агглютинации, реакция пассивной гемагглютинации, иммуноферментный анализ). Ревакцинацию проводят только в случае получения отрицательных иммунологических показателей при очередной проверке иммунитета.

6.2. Неспецифическая профилактика туляремии

Неспецифической профилактике туляремии предшествует организация поиска эпизоотий в природных очагах этой инфекции. На основании результатов эпизоотологического обследования планируют и реализуют комплекс профилактических мероприятий.

Неспецифическую профилактику туляремии проводят по двум основным направлениям:

- устранение условий заражения людей (санитарно-противоэпидемические (профилактические) мероприятия, гигиеническое воспитание и обучение населения, в т. ч. разъяснение значения профилактических прививок против туляремии для населения, выезжающего в природные очаги туляремии);
- снижение лоймопотенциала природных очагов (мероприятия по дератизации и дезинсекции).

Неспецифические мероприятия имеют свои особенности при различных типах заболеваемости.

При трансмиссивных заражениях через кровососущих двукрылых рекомендуется применение репеллентов, защитной одежды, ограничение доступа непривитого населения на неблагополучные территории, а в редких случаях – дезинсекция водоемов.

При промысловых заражениях проводят комплекс регулирующих численность носителей и (или) ограничительных санитарно-противоэпидемических мероприятий в местах промысла зверьков, а также мероприятия по дезинсекции и дезинфекции на складах хранения шкурок. На охоте рекомендуется дезинфицировать руки после снятия шкурок и потрошения зайцев, ондатр, кротов и водяных полевок. Необходима тщательная термическая обработка заячьего мяса перед употреблением его в пищу. Употребление в пищу малосольной зайчатины может вызвать заболевание туляремией.

При вспышках, связанных с контактом населения с зараженным водоемом, необходимо прекратить купание и водопользование, использовать для питья только кипяченую воду, а при заражении колодезной воды – принять меры по очистке колодца от трупов грызунов и дезинфицировать воду.

При заражении во время зимних сельскохозяйственных работ в природных очагах туляремии недопустимо привлечение к ним непривитого населения. Подвергающихся риску заражения лиц обеспечивают защитной одеждой, респираторами, перчатками. Инфицированное зерно, корм и другие субстраты либо уничтожают, либо обеззараживают.

При бытовых заражениях обеспечивают, по возможности, грызунонепроницаемость жилых и подсобных помещений, дератизацию и влажную уборку с применением дезинфицирующих средств, разрешенных к применению в Российской Федерации в установленном порядке.

При производственных и продуктовых заражениях осуществляют санитарно-противоэпидемические мероприятия на предприятиях или на складах, включающие обеззараживание инфицированного сырья и продуктов. На мясокомбинатах производят дезинсекцию скота, поступившего для переработки.

При посещении леса, сборе ягод и т. п. следует проводить взаимоосмотры, удаляя и уничтожая (но не раздавливанием) всех наползших или прикрепившихся иксодовых клещей. Место их прикрепления обрабатывают, например, настойкой йода или бриллиантовой зелени и др. Это же делают при обнаружении ссадин на коже и других повреждениях. При подозрении на попадание инфекции в глаза следует промыть их кипяченой водой, а затем закапать в глаза, например, раствор протаргола или др.

Лоймопотенциал природных очагов туляремии может быть уменьшен за счет проведения комплексных мероприятий, направленных на сокращение численности основных носителей и переносчиков инфекции, а также в результате антропогенной трансформации ландшафта.

Снижение численности клещей достигается: изменением сроков (позднее начало) весеннего выпаса скота, когда заканчивается период активизации клещей, сокращением площади естественных лугов, выпасом скота на искусственных и культурных пастбищах, плановой или экстренной обработкой заклещевленного скота. В случае массового заклещевления обработку скота проводят регулярно с интервалами 7—10 дней для наиболее полного уничтожения взрослых клещей и через 12—15 дней против личинок и нимф. Уничтожение клещей на скоте проводят дезинсекционными средствами (акарицидами), разрешенными к применению для этих целей в установленном порядке, или механическим путем.

Дератизационные мероприятия включают как собственно уничтожение грызунов разными методами, так и агротехнические приемы, препятствующие повышению численности мелких млекопитающих. Хорошие результаты дает прессование сена в тюки, качественная обработка стогов сена и ометов соломы аммиачной водой, складирование кормов после уборки урожая в хорошо оборудованные, грызунонепроницаемые хранилища. Не рекомендуется устанавливать стога сена и ометы соломы по краям оврагов или опушкам леса. Из этих стаций зверьки активно заселяют стога и ометы. В некоторых хозяйствах практикуют зимнюю буксировку сена волоком при помощи тракторов непосредственно к фермам. При этом доставляют и всех обитающих в стогах и ометах грызунов, и повышается риск заражения работников фермы. Полевую дератизацию следует проводить в зимний и ранне-весенний (сразу после схода снежного покрова) периоды.

Миграция мышевидных грызунов из естественных мест обитания в населенные пункты начинается с уборкой урожая и вывозом сельскохозяйственных продуктов с полей, а с наступлением осенних холодов этот процесс становится массовым, особенно в годы высокой численности грызунов. Таким образом, к грызунам, обитающим в населенных пунктах, присоединяются грызуны из естественных мест обитания. Во время

осенних миграций в населенный пункт дикими грызунами может быть занесен возбудитель туляремии, и вследствие этого – развиться эпизоотия этой инфекции среди синантропных грызунов. Поэтому планомерное уничтожение грызунов позволяет предупредить развитие эпизоотии.

Борьба с грызунами в населенных пунктах включает в себя обеспечение грызунонепроницаемости зерно- и овощехранилищ, фуражных складов, других хозяйственных и жилых построек, водоисточников. Истребление грызунов осуществляют при помощи разнообразных орудий лова, отравленных приманок, в т. ч. с созданием точек долговременного отравления грызунов, химических средств, бактериальных препаратов. Важным условием качественного проведения дератизации является координация усилий всех заинтересованных организаций.

Дезинфекцию, дезинсекцию и дератизацию планируют и проводят на основании результатов эпизоотологического обследования и обязательно оценивают эффективность проводимых мероприятий.

6.3. Специальная подготовка медицинских и других работников на территории, энзоотичной по туляремии

На территории, энзоотичной по туляремии, все медицинские работники, а также лица, ответственные за организацию работы и массовые мероприятия на неблагополучных участках территории, должны быть осведомлены по вопросам клиники, дифференциальной диагностики туляремии, а также о характерных признаках болезни и обучены правилам по проведению профилактических и противоэпидемических мероприятий, снижающих риск заражения человека.

Мероприятия по подготовке организовывают и осуществляют специалисты по особо опасным инфекциям территориальных управлений (территориальных отделов территориальных управлений) или центров гигиены и эпидемиологии (филиалов центров гигиены и эпидемиологии) и противочумных станций.

6.4. Гигиеническое обучение и воспитание населения

6.4.1. При использовании средств массовой информации (местная печать, радио, телевидение, лекции, беседы и др.) специалисты территориальных управлений (территориальных отделов территориальных управлений) и центров гигиены и эпидемиологии (филиалов центров гигиены и эпидемиологии) информируют население об особенностях заболевания и мерах по его предупреждению: указывают на возможные источники инфекции, пути заражения, разнообразие клинических проявлений и необходимость раннего обращения к врачу при появлении первых признаков заболевания, разъясняют значение профилактических прививок против туляремии для населения, выезжающего в природные очаги туляремии, а также знакомят с мерами личной защиты.

6.4.2. Гигиеническое воспитание и обучение проводят с работниками ферм, сахарных заводов, мясо- и льнокомбинатов, рыболовных и охотничьих хозяйств – контингента, наиболее подверженного риску заражения возбудителем туляремии.

• *Синантропный (урбанический) тип очага.* Очаги находятся на территории городов, поселков или их окраинах. Основными носителями возбудителя туляремии являются синантропные грызуны – домовая мышь и серая крыса. Эпизоотии могут возникать в результате «заноса» возбудителя мигрирующими грызунами из природных биотопов в строения, обычно осенью и в начале зимы, а к весне – затухать. В циркуляцию возбудителя туляремии включаются восточно-европейские обыкновенные полевки, часто заселяющие стога и ометы, расположенные вблизи построек и жилищ человека.

Туляремийные очаги устойчивы, непрерывное существование некоторых из них прослежено более 60 лет, но они могут трансформироваться в результате хозяйственной деятельности человека и изменять свой лоймопотенциал.

Природные очаги туляремии полигостальны и поливекторны. Циркуляция возбудителя осуществляется в них среди фоновых видов ММ и иксодовых клещей, однако и другие сочлены паразитарной системы вовлекаются в этот процесс.

Всех млекопитающих по отношению к туляремийной инфекции и их роли в эпизоотическом процессе разделяют на 3 группы.

Первая группа. Высоковосприимчивые и высокочувствительные млекопитающие (заражаются при попадании в организм единичных туляремийных бактерий, 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 бактерий, болеют тяжело, но быстро освобождаются от возбудителя, приобретая устойчивый иммунитет). К этой группе относятся полевая мышь, все виды крыс и сусликов, белки, бурундуки, бобры, ежи, выхухоль, куторы, белозубки и некоторые другие виды млекопитающих.

Третья группа. Маловосприимчивые и практически нечувствительные млекопитающие. К ним относятся большинство хищных млекопитающих и сельскохозяйственных животных.

Наибольшее эпизоотологическое и эпидемиологическое значение имеют животные 1-й группы, поэтому тактика эпизоотологического обследования строится с учетом того, к какой группе относятся обитающие в очаге животные.

gost.e-ecolog.ru