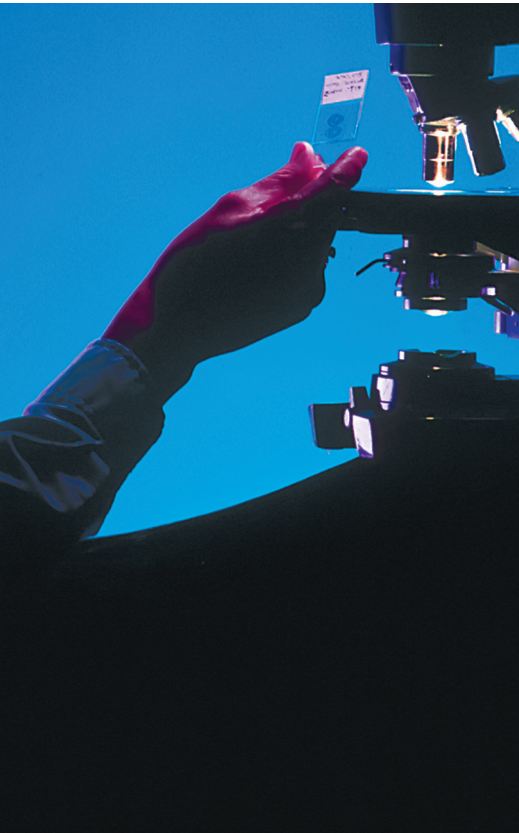


ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ
ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА
Федеральное казённое учреждение здравоохранения
«Иркутский ордена Трудового Красного Знамени
научно-исследовательский противочумный
институт Сибири и Дальнего Востока»

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ ПО ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ТУЛЯРЕМИИ



УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ
ДЛЯ ВРАЧЕЙ-БАКТЕРИОЛОГОВ

ИРКУТСК – 2022

Федеральная служба по надзору в сфере защиты
прав потребителей и благополучия человека
Федеральное казенное учреждение здравоохранения
«Иркутский ордена Трудового Красного Знамени
научно-исследовательский противочумный институт
Сибири и Дальнего Востока»

**РУКОВОДСТВО
К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ
ПО ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ
ТУЛЯРЕМИИ**

**Учебное пособие
для врачей-бактериологов**

Иркутск – 2022

УДК 616.91-071
ББК 53.4:55.146
P85

Руководство к практическим занятиям по лабораторной диагностике туляремии: учебное пособие для врачей-бактериологов. – Иркутск: ИНЦХТ, 2022 – 56 с.

ISBN 978-5-98277-363-0

Утверждено Ученым советом
ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский
противочумный институт Роспотребнадзора»

Настоящее учебно-методическое руководство предназначено для врачей-бактериологов, лаборантов, обучающихся на четырехмесячных курсах первичной специализации врачей (биологов) по особо опасным инфекциям, а также для проведения целевых тематических циклов по лабораторной диагностике туляремии.

Авторы:

*В.Ю. Колесникова, Т.Ю. Загоскина, Т.М. Долгова, О.Б. Колесникова,
О.В. Гаврилова, О.А. Старикова, А.В. Мазена, Е.С. Куликалова,
А.К. Сынгеева, С.В. Балахонов*

ISBN 978-5-98277-363-0



© Коллектив авторов, 2022
© ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский
противочумный институт Роспотребнадзора, 2022
© Оформление ИНЦХТ, 2022

СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений	4
Введение	5
I. Краткая характеристика основных биологических свойств возбудителя туляремии	6
1. Изучение биологических свойств туляремийного микроба ...	12
Занятие 1	12
Занятие 2	14
II. Лабораторная диагностика туляремии	15
2. Лабораторный диагноз туляремии	22
Занятие 3	22
Занятие 4	25
Занятие 5	26
Занятие 6	28
3. Серологические методы исследования на туляремию	29
Занятие 7	29
Занятие 8	30
III. Молекулярно-генетические методы исследования	31
Занятие 9	32
IV. Времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS) для индикации и идентификации возбудителя туляремии ...	33
Приложение	36
1. Питательные среды для изучения свойств возбудителя туляремии	36
2. Методики изучения биологических свойств возбудителя туляремии	38
3. Серологические реакции, направленные на выявление антител в сыворотке больного	44
4. Аллергические реакции	47
5. Молекулярно-генетический метод (ПЦР с родоспецифическими праймерами)	48
Паспорт штамма	53
Контрольные вопросы для подготовки к практическим занятиям	54
Нормативные документы и рекомендуемая литература	55

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЕ	– антигенные единицы
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ	– дезоксинуклеозидтрифосфат
ЖКТ	– желудочно-кишечный тракт
ИФА	– иммуноферментный анализ
л/у	– лимфатический узел
ЛПС	– липополисахарид
мкл	– микролитр
МПА	– мясо-пептонный агар
МПБ	– мясо-пептонный бульон
МФА	– метод флуоресцирующих антител
н/к	– наочно
НКС	– нормальная кроличья сыворотка
н.п.	– нуклеотидные пары
ОРА	– ориентировочная реакция агглютинации
ОСО	– отраслевой стандартный образец
п/к	– подкожно
ППН	– показатель повреждения нейтрофилов
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РА	– реакция агглютинации
РНАг	– реакция нейтрализации антигена
РНАт	– реакция нейтрализации антител
РНГА	– реакция непрямой гемагглютинации
РТНГА	– реакция торможения непрямой гемагглютинации
СЕ	– сывороточные единицы
т.п.н.	– тысяч пар нуклеотидов
ЭДТА	– этилендиаминтетрауксусная кислота
кD	– килодальтон
FT-агар	– коммерческая среда для культивирования туляремийного микроба
RD	– области геномных отличий
VNTR	– локусы, варьируемые по числу tandemных повторов
SNP	– полиморфизм единичных нуклеотидов

ВВЕДЕНИЕ

Предлагаемое учебно-методическое пособие предназначено для организации и проведения практических занятий на тематических циклах усовершенствования и курсах первичной специализации врачей (биологов) и лаборантов по особо опасным инфекциям, включает традиционные и современные методы лабораторной диагностики туляремии.

Теоретический и практический курс освещает основные биологические свойства возбудителя туляремии, микробиологические, иммунологические и молекулярно-генетические методы лабораторной диагностики. Учебный материал рассчитан на 30 ч и распределен на 9 практических занятий, каждое из которых включает план, методические указания к выполнению заданий и перечень необходимых материалов и оборудования.

В приложении приведены рецепты основных питательных сред, методики изучения биологических свойств возбудителя туляремии, образец паспорта штамма, выделенного из исследуемого материала, список использованных сокращений, контрольные вопросы для подготовки к практическим занятиям и список литературных источников.

Проведению занятий должна предшествовать тщательная подготовка курсантов по вопросам противоэпидемического режима работы с материалом, зараженным или подозрительным на зараженность микроорганизмами I–II групп патогенности.

I. КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУЛЯРЕМИИ

Туляремия является острым инфекционным природно-очаговым заболеванием с поражением лимфатических узлов, паренхиматозных органов, кожных покровов, иногда глаз, зева, легких и сопровождается выраженной интоксикацией. Заболевание преимущественно встречается в ландшафтах умеренного климатического пояса Северного полушария.

Основным резервуаром и источником инфекции при туляремии являются многочисленные виды диких грызунов, зайцеобразные и др. Основная роль в поддержании инфекции в природе принадлежит грызунам (водяная крыса, обыкновенная полевка, ондатра и др.). Большой человек не опасен для окружающих.

Механизм передачи заболевания множественный, чаще всего трансмиссивный. Возбудитель сохраняется в природе в цикле «клещ-животное». Сельскохозяйственным животным и птицам передается клещами и кровососущими насекомыми. Специфические переносчики туляремии – иксодовые клещи. Человек заражается туляремией в результате прямого контакта с животными (снятие шкур, сбор павших грызунов и др.), а также алиментарным путем через инфицированные грызунами пищевые продукты и воду. Часто заражение происходит через кровососущих переносчиков (клещи, комары, блохи, слепни и другие членистоногие). Возможно заражение и аспирационным путем (при вдыхании инфицированной пыли от зерна, соломы, овощей). Зарегистрированы случаи заболеваний людей на производствах, связанных с переработкой природного сырья (сахарные, крахмалопаточные, спиртовые заводы, элеваторы и т.п.), на мясокомбинатах, при забое овец и крупного рогатого скота, на котором имелись инфицированные клещи.

Пути заражения: контактный (через кожу и слизистую оболочку глаз), трансмиссивный (при укусе переносчика), алиментарный (через ЖКТ), аспирационный (через дыхательные пути).

Возбудитель туляремии относится к γ -подклассу протеобактерий, семейству *Francisellaceae*, роду *Francisella*, который включает два вида: *F. tularensis* и *F. Philomiragia* (СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»). В пределах вида *F. tularensis* выделяют 4 подвида: *F. tularensis* subsp. *tularensis* или *nearctica* – неарктический, американский (или тип А), *F. tularensis* subsp. *holarctica* – голарктический (или тип Б), *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* – среднеазиатский и *F. tularensis* subsp. *novicida*. Подвид *holarctica* включает в себя три биологических варианта: *japonica* – японский биовар (*bv. japonica*), биовар I *Ery(S)* (эритромицинчувствительный) и биовар II *Ery(R)* (эритромицинрезистентный). На территории Российской Федерации распространен в основном голарктический подвид, резервуаром которого в природе преимущественно являются грызуны и зайцеобразные, и среднеазиатский подвид, ареалом обитания которого являются Республика Алтай, Алтайский и Красноярский края.

Внутривидовая дифференциация возбудителя туляремии основывается на различиях подвидов и биоваров по ряду фенотипических признаков: биохимической активности, степени патогенности для человека и животных, чувствительности к некоторым антибиотикам, на особенностях экологии возбудителя и его ареале. На генотипическом уровне подвиды различаются при VNTR-анализе генома. На территории России встречается *F. tularensis* подвида *holarctica* с двумя биоварами – I *Ery(S)* и II *Ery(R)*, циркуляция которых осуществляется главным образом среди грызунов и зайцеобразных. Распространение их также возможно через иксодовых клещей и водные объекты.

Возбудитель туляремии *F. tularensis* в мазках 1–2-суточной культуры, выращенной на плотных питательных средах, представляет собой кокковидные клетки диаметром 0,3–0,5 мкм. В мазках, приготовленных из культуры с жидких питательных сред, туляремийный микроб имеет форму коротких палочек. В тканях животных, погибших от туляремии, возбудителя обнаруживают в виде коккобактерий. При длительном выращивании на питательных средах туляремийные бактерии проявляют значительный полиморфизм: встречаются как более крупные, шарообразные до 3 мкм в диаметре клетки, так и мельчайшие до 0,1–0,2 мкм.

Туляремийные бактерии неподвижны, грамтрицательные, но окрашиваются бледнее анилиновыми красителями, чем другие грамтрицательные бактерии, размножаются почкованием, спор не образуют, выделяют капсулоподобное слизистое вещество.

Слизистую консистенцию культуры выявляют в окрашенных мазках и при эмульгировании бактериальной массы в капле физиологического раствора (культура тянется за петлей). В мазках, окрашенных по Граму, обильную слизь обнаруживают в виде сплошной тонкой сеточки розового цвета.

Бактерии туляремии – факультативные анаэробы. Оптимальная температура их выращивания 36–37 °С, при более низкой температуре размножение происходит медленнее, а ниже 20 °С – прекращается. Оптимальная концентрация водородных ионов в средах для выращивания туляремийного микроба 6,8–7,4. Возбудитель туляремии не растет на обычных питательных средах – МПА и МПБ (исключение – *F. tularensis* subsp. *novicida*), а требует для своего выращивания среды, содержащие кровь, яичный желток или их заменители. На этом основана дифференциальная диагностика туляремийного микроба. Из плотных питательных сред, применяемых для выращивания *F. tularensis*, наиболее распространена свернутая желточная среда Мак-Коя. Культура туляремийного микроба на ней растет в виде извилистого, блестящего, нежного, почти бесцветного, слизистого налета, хорошо снимающегося петлей. Поверхность посева состоит из множества слившихся мелких колоний, напоминающих «шагреновую кожу». Рост в виде отдельных колоний встречается только при посеве из органов животных со скудным содержанием туляремийных бактерий и появляется в более поздние сроки (на 9–12 сутки).

Наравне со свернутой желточной средой Мак-Коя для выращивания возбудителя туляремии используют кровяную среду Емельяновой, FT-агар, среды, приготовленные на основе сухого агара для выращивания туляремийного микроба, в том числе с добавлением антибиотиков.

Культура в S-форме на кровяной среде Емельяновой вырастает в виде круглых с ровными краями, равномерно выпуклых, гладких, слабо блестящих беловатого цвета гомогенных колоний, размером до 1–2 мм в диаметре. Бактерии, образующие колонии в S-форме, высоковирулентны для лабораторных животных, колонии слабовирулентных штаммов (SR-форма) более крупных размеров. Авирулентные культуры вырастают в R-форме и агглютинируются трипафлавином.

Туляремийные бактерии слабо ферментируют до кислоты лишь немногие углеводы и спирты на специальных средах. Среда Гисса для этого не пригодна. Ферментирующая способность у разных подвидов туляремийного микроба неодинакова (табл. 1).

Таблица 1

Характеристика *F. tularensis* (по подвидам) и *F. philomiragia*

Признак	Подвиды <i>Francisella tularensis</i>				<i>Francisella philomiragia</i>
	<i>tularensis</i>	<i>holarctica</i>	<i>mediasiatica</i>	<i>novicida</i>	
Размер, мкм	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 1,5	< 1,5
Наличие капсулы	+	+	+	–	н/д
Тинкториальные свойства	Гр ⁻	Гр ⁻	Гр ⁻	Гр ⁻	Гр
Подвижность	–	–	–	–	–
Рост на стандартных средах	–	–	–	+ (–)	+
Рост на среде сцистеином	+	+	+	–	–
Рост в питательном бульоне, 0 % NaCl	–	–	–	–	–
Рост в питательном бульоне, 6 % NaCl	–	–	–	+ (–)	+ (–)
Оптимальная температура культивирования, °С	37	37	37	37	25 или 37
Образование H ₂ S на среде с цистеином	+	+	+	+	+
Образование H ₂ S на стандартных средах	–	–	–	–	+
Образование индола	–	–	–	–	+
Образование уреазы	–	–	–	–	–
Восстановление нитратов	–	–	–	–	–
β-лактамазная активность	+	+	–	+	+
Ферментация до кислоты:					
мальтоза	+	+	–	+ (–)	+
лактоза	–	–	–	–	–
сахароза	–	–	–	+	+
D-глюкоза	+	+	–	+	+ (–)
глицерин	+	–	+	+ (–)	–
Продукция цитриуллинуреидазы	+	–	+	+	н/д
Продукция индофеноксидазы	–	–	–	–	+
Продукция каталазы	+	+	+	+	+
Протеолитическая активность	–	–	–	–	+
Агглютинабельность с противотуляремийной сывороткой	+	+	+	+ (–)	–

Моль% G + С ДНК	33–36	33–36	33–36	34	33–34
% гомологии по гену 16 S рПНК с <i>F. tularensis</i> ATCC 6223	≥ 99,8	≥ 99,8	≥ 99,8	≥ 99,8	≥ 98,3
Наличие гена <i>lpr</i> , кодирующего синтез белка молекулярной массой 17 kD	+	+	+	+	+
LD50 для кроликов, м.к.	< 101	> 106	> 106	> 106	н/д
Минимальная заражающая доза для мышей, м.к.	< 103	< 103	< 103	–	н/д
Ареал распространения	Только на территории Северной Америки	На территории северного полушария, за исключением Англии, Исландии и Португалии	Средняя Азия, Республика Алтай, Алтайский и Красноярский край Российской Федерации	Территория северной Америки, единичные случаи в Австралии и Таиланде	Территория Северной Америки

Примечание: н/д – нет данных; +(–) – признак характерен для большинства выделенных штаммов.

Липополисахарид туляремийного микроба является основным иммунодоминантным антигеном и мишенью специфического антительного ответа макроорганизма на возбудитель. На выявлении специфических туляремийных антител против эпитопов ЛПС основана серологическая диагностика туляремии у человека и животных. Структура и антигенная специфичность ЛПС бактерий *F. tularensis* трех основных подвидов (кроме *F. tularensis* subsp. *novicida*) идентична. В отличие от классических эндотоксинов, препараты ЛПС возбудителя туляремии характеризуются биологической инертностью – они являются слабыми индукторами цитокинов и не токсичны для лабораторных животных. Экзотоксин у бактерий туляремии не обнаружен. Для человека высокопатогенен подвид *tularensis*, подвиды *holarctica* и *mediasiatica* умеренно патогенны.

Геном туляремийного микроба представлен хромосомой, размер которой около 1830 т.п.н. У большинства представителей семейства *Francisellaceae* не обнаружены собственные фаги и плазмиды. Исключение составляет только *F. tularensis* subsp. *novicida*, у которой выявлена мелкая криптическая плазида рFN. Для обнаружения ДНК возбудителя туляремии в исследуемом материале используется молекулярно-генетический метод – полимеразная цепная реакция (ПЦР). В основе ПЦР – выявление в геноме возбудителя нуклеотидных последовательностей, детерминиру-

ющих факторы патогенности *F. tularensis*. Причина высокой патогенности туляремийного микроба до конца не определена. Из числа возможных факторов вирулентности рассматриваются: липополисахарид (ЛПС), белок размером 23 kD, ферменты биосинтеза пуринов, пептидогликанов, Clp-протеаза теплового шока, белки патогенности Pdp, регуляторные белки MglA и MglB. Все они имеют значение для персистенции патогена в макрофагах – важного этапа в развитии инфекционного процесса. Однако наиболее специфичными из изученных генов являются *forA*, отвечающий за синтез наружной мембраны и *iglABCD* оперон, кодирующий синтез белка размером 23 kD. Они имеют высокую степень сходства у всех подвидов туляремийного микроба, и на их основе осуществляется синтез туляремийных родоспецифичных праймеров для ПЦР.

Генетическую вариабельность подвидов и отдельных штаммов туляремийного микроба связывают с наличием областей дифференциации RD, с вариабельными тандемными повторами (VNTR) и полиморфизмом единичных нуклеотидов (SNP). VNTR- и SNP-типирование *F. tularensis* позволяет проводить межподвидовую и межштаммовую дифференциацию, устанавливать географическое происхождение возбудителя.

Возбудитель туляремии обладает выраженными аллергизирующими свойствами. Аллергенное действие характерно как для живых, так и убитых бактерий туляремии – различной степени вирулентности. На этом свойстве *F. tularensis* основан аллергический метод диагностики туляремии у человека. Туляремийный микроб патогенен для многих видов животных и человека. Из лабораторных животных высокую чувствительность к туляремии проявляют белые мыши и морские свинки. При подкожном заражении инфицированным материалом белые мыши в среднем погибают на 3–4 сутки, и при вскрытии у них обнаруживают: резкую гиперемию и отечность сосудов подкожной клетчатки; воспалительный инфильтрат в месте введения материала; увеличение, гиперемию и уплотнение регионарных лимфатических узлов, печени, селезенки; гиперемию стенок кишечника.

Морские свинки при подкожном заражении инфицированным материалом погибают на 6–9 сутки. Патологоанатомические изменения в органах морской свинки при гибели от туляремийной инфекции хорошо выражены. При вскрытии у них обнаруживают: гиперемию и отек сосудов подкожной клетчатки, воспалительный инфильтрат с геморрагиями и участками некроза в месте введения материала; резкое увеличение, гиперемию и уплотнение регионарных лимфатических узлов, печени, селезенки. На поверхности и в глубине ткани селезенки, печени хорошо заметны некротические узелки сероватого цвета («саговая селезенка»). В брюшной полости накапливается серозно-геморрагический экссудат.

1. ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ТУЛЯРЕМИЙНОГО МИКРОБА

ЗАНЯТИЕ 1 (4 ч)

1.1. Приготовление питательной среды для выращивания туляре- мийного микроба

1.1.1. Приготовить среду Мак-Коя (прил. 1.1).

Примечание:

- среду Мак-Коя готовят из одного желтка куриного яйца;
- приготовленную среду помещают в термостат при 37 °С для кон-
троля на стерильность.

Материал и оборудование

Яйцо куриное	1 шт.
Мыло	1 шт.
Щетка	1 шт.
Пинцет	1 шт.
Ножницы	1 шт.
Тампон ватный стерильный	1 шт.
Спирт в чашке Петри	10 мл
Цилиндр градуированный стерильный	1 шт.
Пипетка стерильная на 5 мл	1 шт.
Пробирка бактериологическая стерильная	6 шт.
0,9%-й раствор хлористого натрия	15 мл
Аппарат Коха	1 шт.
Термостат на 37 °С	1 шт.

1.2. Изучение культуры туляремиийного микроба

1.2.1. Изучить характер роста культуры на средах Мак-Коя и Ft-агаре.

1.2.2. Изучить морфологию микроба в мазках, окрашенных по Граму и обработанных туляремиийной люминесцирующей сывороткой (прил. 2.2).

1.2.3. Просмотреть мазки-отпечатки из органов животных, окра-
шенных по Романовскому-Гимзе (прил. 2.1).

1.2.4. Поставить ориентировочную реакцию агглютинации (ОРА)
с туляремиийной диагностической сывороткой 1:10.

1.2.5. Поставить развернутую РА с туляремиийной диагностической
сывороткой 1:50 (прил. 2.4).

1.2.6. Посеять изучаемую культуру в пробирку каждой среды: Мак-Коя, Ft-агар, скошенного МПА, скошенного агара с глицерином, на среду с цитруллином (прил. 1.4, 1.5).

1.2.7. Посеять изучаемую культуру на Ft-агар для определения чувствительности к эритромицину (прил. 2.3).

Примечание:

- Произвести записи в журналах:
 - а) «учета ПБА, находящихся в рабочей коллекции»;
 - б) «движения патогенных биологических агентов».

Материал и оборудование

Двухсуточная культура туляреминого микроба, засеянная в две пробирки среды Мак-Коя и одну пробирку Ft-агар	3 пробирки
Мазок-отпечаток из органов животных, окрашенный по Романовскому-Гимзе	1 шт.
Сыворотка туляреминая люминесцирующая из набора реагентов «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие туляреминые сухие», разведенная до рабочего титра	1 мл
Сыворотка диагностическая туляреминая 1 : 10 из набора реагентов «Диагностикум туляреминый цветной сухой»	0,5 мл
Сыворотка диагностическая туляреминая 1 : 50	2 мл
Пробирка бактериологическая для РА	10 шт.
Пипетка стерильная на 1 или 2 мл	3 шт.
0,9%-й раствор хлористого натрия	100 мл
Дистиллированная вода	50 мл
Среда Мак-Коя	1 пробирка
Ft-агар	1 пробирка
МПА	1 пробирка
Агар с глицерином	1 пробирка
Среда с цитруллином (2 мл)	1 пробирка
Ft-агар	1 чашка
Диск с эритромицином 15 мкг	1 шт.
Предметное стекло	2 шт.
Покровное стекло	1 шт.
Фиксатор (96°-й спирт)	150 мл
Стакан для промывания мазков	3 шт.
Кристаллизатор для промывания мазков	1 шт.
Набор для окрашивания мазков по Граму	1 шт.

Глицерин для микроскопии	0,2 мл
Иммерсионное масло	0,1 мл
Нефлуоресцирующее иммерсионное масло	0,1 мл
Микроскоп световой	1 шт.
Микроскоп люминесцентный	1 шт.
Термостат на 37 °С	1 шт.

ЗАНЯТИЕ 2 (2 ч)

1.3. Окончание изучения культуры туляремийного микроба

1.3.1. Отметить характер роста культуры на средах Мак-Коя и Ft-агаре.

1.3.2. Проверить чистоту роста культуры мазком, окрашенным по Граму.

1.3.3. Отметить отсутствие роста изучаемой культуры на МПА.

1.3.4. Отметить ферментацию глицерина.

1.3.5. Определить цитруллинуреидазную активность.

1.3.6. Определить чувствительность изучаемой культуры к эритромицину.

1.3.7. Результаты изучения биологических свойств туляремийного микроба внести в таблицу 2.

Таблица 2

Биологические свойства туляремийного микроба

Вид возбудителя	Морфология микроба в мазках по Граму	Рост на среде Мак-Коя	Рост на МПА	Ферментация глицерина	Цитруллинуреидаза	Чувствительность к эритромицину	Серологические свойства	
							МФА	Развернутая РА с туляремийной сывороткой 1 : 50

Примечание:

- учет результатов изучения биологических свойств туляремийного микроба провести через 48 ч инкубации;
- передать все имеющиеся посевы культур туляремийного микроба для обеззараживания;
- произвести записи в журналах: «движения патогенных биологических агентов» и «учета ПБА, находящихся в рабочей коллекции»;
- составить акт на уничтожение культуры возбудителя туляремии.

Материал и оборудование

0,9%-й раствор хлористого натрия	2 мл
Предметное стекло	1 шт.
Кристаллизатор для промывания мазков	1 шт.
Набор для окрашивания мазков по Граму	1 шт.
Иммерсионное масло	0,1 мл
Микроскоп световой	1 шт.

II. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ТУЛЯРЕМИИ

Лабораторная диагностика туляремии осуществляется в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», методическими указаниями «Эпидемиологический надзор за туляремией» МУ 3.1.2007-05 и основана на комплексном подходе, направленном на выявление, как живых бактерий, так и специфических агентов или специфических антител против туляремийного микроба. Однако эффективность диагностики во многом зависит от правильности сбора и доставки исследуемого материала.

При проведении лабораторной диагностики исследуют:

- *от больных людей:* содержимое бубона, материал из зева, конъюнктивы глаза, отделяемое язвы, мокроту, кровь и сыворотку крови;
- *от умерших людей:* увеличенные лимфатические узлы, измененные участки легких и селезенки;
- *при эпизоотологическом обследовании:* диких млекопитающих или их трупы, подснежные гнезда грызунов, продукты жизнедеятельности млекопитающих, погадки птиц, помет хищных млекопитающих, а также солому, мякину, талую воду и другие объекты, загрязненные выделениями грызунов, воду из естественных водоемов и колодцев, гидробионтов, членистоногих (преимущественно иксодовых клещей), мелких эктопаразитов, собранных с млекопитающих (вшей, гамазовых и краснотелковых клещей, блох). При трансмиссивных вспышках исследуют кровососущих двукрылых (комаров, слепней и др.). Серологические исследования сывороток крови домашних животных проводят при соответствующих эпизоотологических и эпидемиологических показаниях.

При исследовании на туляремию в лабораторию поступает патологический материал от больных или переболевших людей, домашних животных, погадки хищных птиц, кровососущие членистоногие (клещи, блохи, вши, комары, слепни и т.д.), объекты окружающей среды (вода, пищевые продукты, зерно, фураж и т.д.).

Лабораторная диагностика туляремии базируется на серологических (МФА, ИФА, реакция агглютинации, реакция непрямой гемагглютинации, реакция нейтрализации антител), молекулярно-генетических (ПЦР), бактериологических (бактериоскопия, посевы на питательные среды), биологических (заражение биопробных животных) и аллергических методах исследования (рис. 1–4).

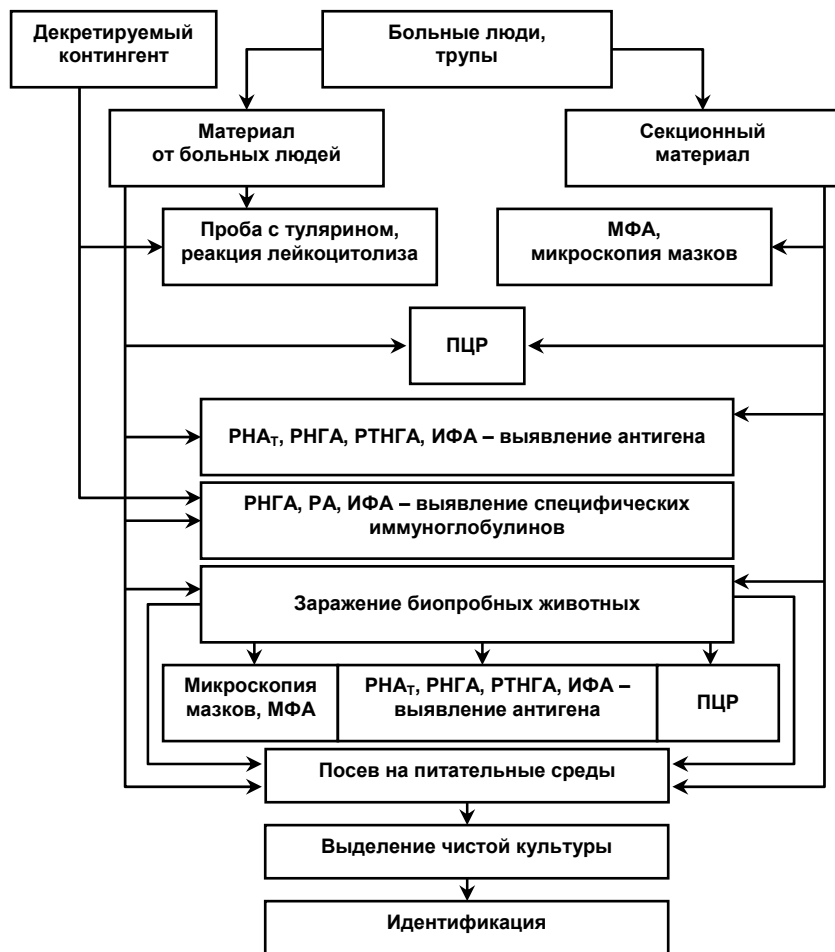


Рис. 1. Лабораторная диагностика туляремии (материал от больных людей и трупов).

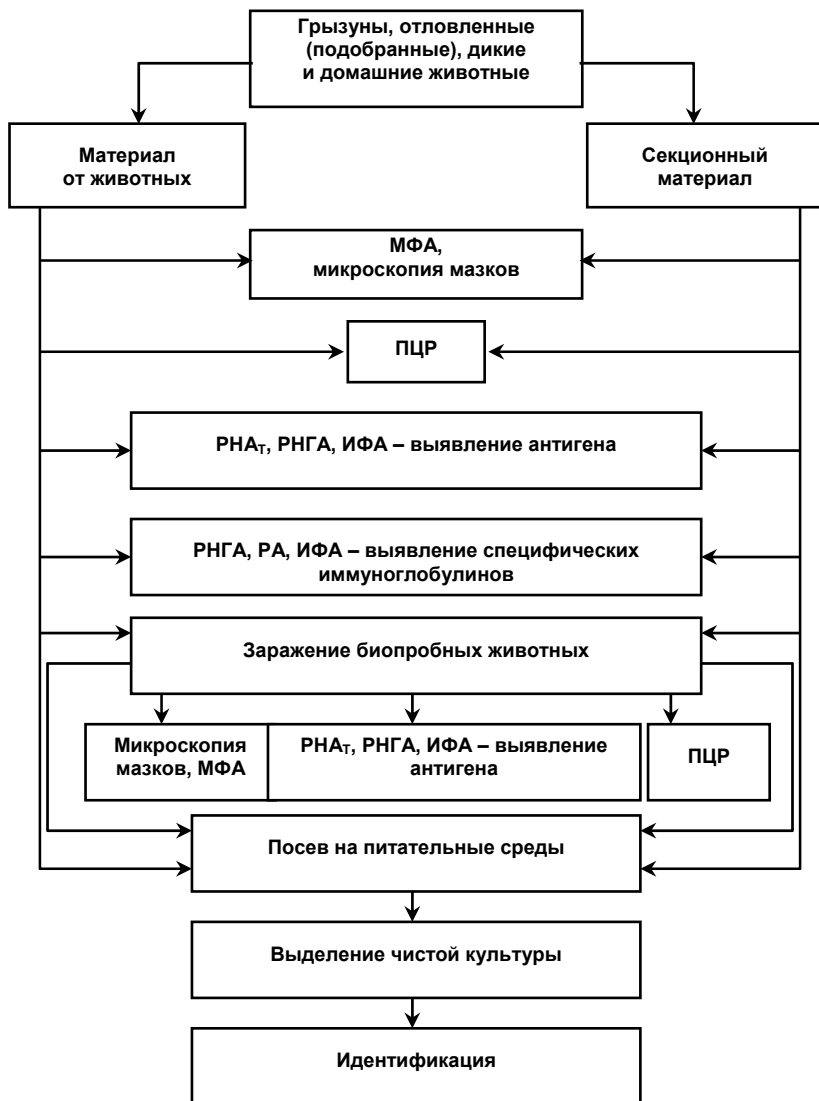


Рис. 2. Лабораторная диагностика туляремии (материал от отловленных (подобранных) грызунов и диких или домашних животных).

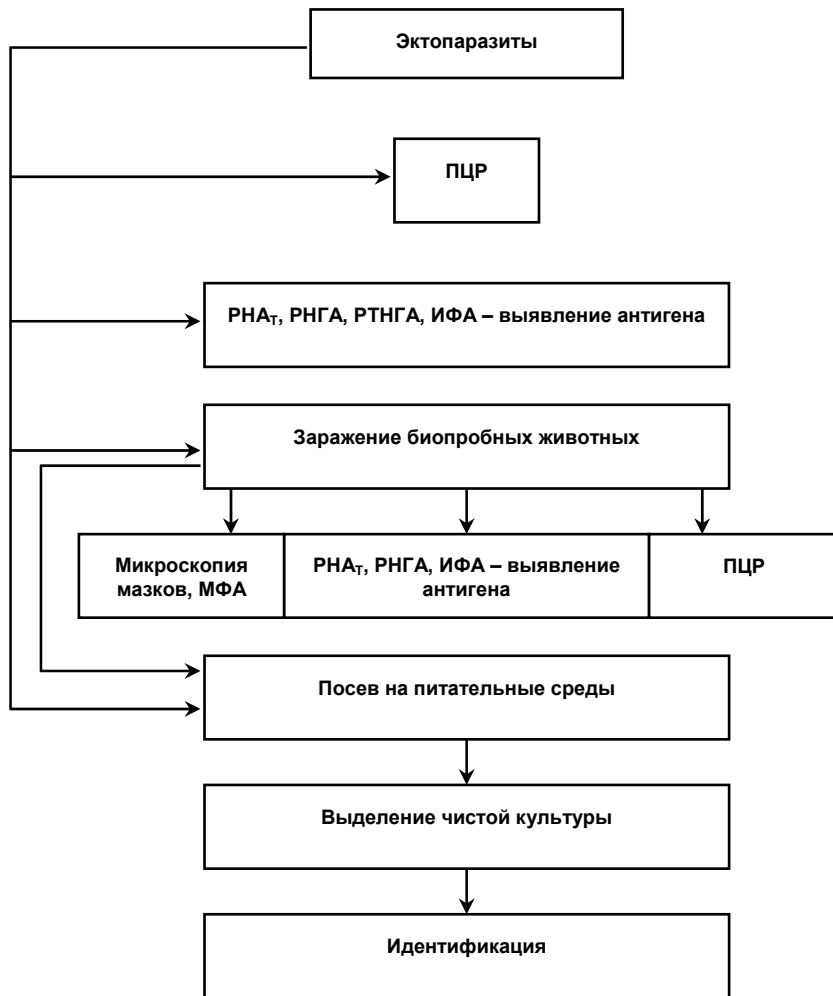


Рис. 3. Лабораторная диагностика туляремии (исследование эктопаразитов).

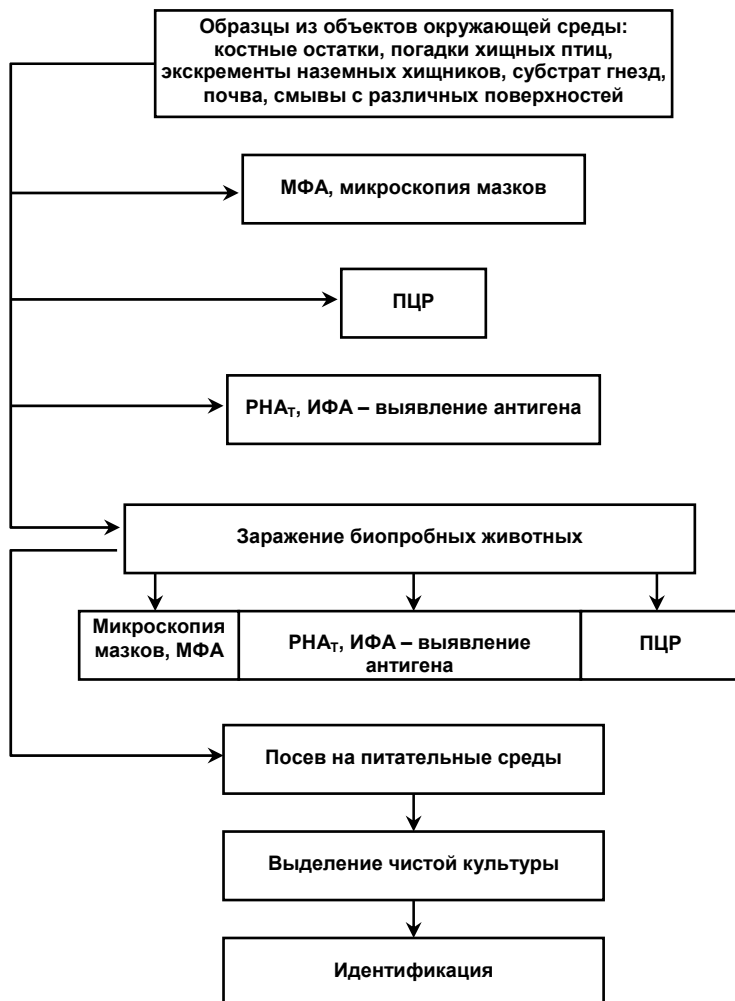


Рис. 4. Лабораторная диагностика туляремии (образцы из объектов окружающей среды).

Лабораторная диагностика туляремии у людей базируется, главным образом, на сероаллергических методах. Из аллергических методов используют накожную и внутрикожную пробу с тулярином, реакцию лейкоцитолита. Из серологических реакций ставят реакцию агглютинации (РА), микрореакцию агглютинации с цветным тулярийным диагностикумом, реакцию непрямой гемагглютинации (РНГА), кровя-

но-капельную реакцию. Бактериологические методы не всегда эффективны, что определяется особенностями течения инфекции у человека, малой обсемененностью органов и тканей возбудителем. Выделение возбудителя наиболее вероятно в течение первых 2–3 недель от начала заболевания и реже в более поздние сроки. В эти же сроки с материалом от больного человека ставят ПЦР.

Домашних животных на туляремию исследуют иммунологическими методами.

При эпизоотологическом обследовании территорий, существенную роль играют серологические методы исследования, позволяющие с меньшими трудозатратами и в короткий срок дать заключение об эпизоотическом состоянии территории. В последние годы находит применение высокочувствительный метод ПЦР, позволяющий по обнаружению специфической ДНК судить о наличии возбудителя туляремии в пробе и выявлять «некультивируемые» формы микроорганизма. В практике эпизоотологического исследования на туляремию основное место принадлежит бактериологическим методам, обеспечивающим выявление и выделение возбудителя. Отловленных с одной территории животных вскрывают, группируют по 5–10 особей и включают в одну биологическую пробу. При групповом анализе мазки и посевы от каждого зверька не делают. Для серологического исследования от грызунов, отловленных живыми, берут кровь из сердца на обнаружение антител к туляреминому микробу.

Животных, у которых на вскрытии обнаружены характерные для туляремии патологоанатомические изменения, исследуют индивидуально. Просматривают окрашенные по Романовскому-Гимзе и обработанные люминесцентной сывороткой мазки-отпечатки из органов. Производят посевы органов на плотные питательные среды. Забирают материал для серологического исследования на обнаружение туляреминого антигена (РНГА, РНАт реакция кольцепреципитации) и на обнаружение специфической ДНК (ПЦР). Ставят индивидуальную биопробу.

Животных, погибших в природе, исследуют индивидуально. Органы трупа, если они не подверглись сильному разложению, засевают на плотные питательные среды с антибиотиками, готовят мазки-отпечатки и заражают биопробных животных. Параллельно ставят серологические реакции на обнаружение туляреминого антигена, ПЦР на обнаружение специфической ДНК. Если на исследование поступает труп грызуна, с выраженными процессами гниения, посевы на питательные среды не делают, а ограничиваются накожным или подкожным заражением белых мышей. В некоторых случаях от трупа исследуют только костный или головной мозг. Павших биопробных животных немедленно

вскрывают. Выживших – хлороформируют (белых мышей на 21-е сутки, морских свинок на 25-е сутки) и делают посев селезенки на свернутую желточную среду.

Кроме грызунов, биологическим методом исследуют добытых в природе и снятых с грызунов кровососущих членистоногих и других беспозвоночных животных. Иксодовых клещей объединяют до 50 экземпляров в одну биологическую пробу. Гамазовых клещей, блох, вшей сортируют по родам, видам и группируют в отдельные пробы. Комаров объединяют до 100, мошек до 250, слепней по 25–50 экземпляров на одну биопробу.

Объекты окружающей среды также исследуют биологическим методом. Непосредственный посев материала на питательные среды не эффективен в виду его незначительной обсемененности возбудителем и загрязнением посторонней микрофлорой, подавляющей рост микроба туляремии. В этом случае можно использовать высокоселективные среды с антибиотиками. Идентификацию возбудителя туляремии проводят на основании следующих признаков:

- морфологии и окраски микроба в мазках;
- специфического свечения в МФА;
- характера роста на плотных питательных средах;
- отсутствия роста на простых питательных средах (МПА, МПБ);
- РА со специфической туляремийной сывороткой;
- выявление родоспецифичной ДНК в ПЦР;
- патогенности для лабораторных животных (белые мыши, морские свинки).

Культура должна иметь характерный для микроба туляремии рост на плотных питательных средах (Мак-Коя, FT- агаре и др.), не расти на простых питательных средах (кроме *F. tularensis* subsp. *novicida*), агглютинироваться диагностической туляремийной сывороткой до титра или до ½ титра, вызывать гибель биопробных животных. Выделенные штаммы желательно типировать до подвида и дифференцировать на биологические варианты.

К серологическим методам диагностики туляремии относятся:

- реакции, направленные на выявление антител к туляремийному микробу (кровяно-капельная, РА, РНГА, РТНГА и др.);
- реакции, направленные на выявление антигенов туляремийного микроба (РНАт, кольцепреципитации, МФА, РА, РНГА, РТНГА и др.).

Серологические реакции используют для обследования и выявления природных очагов туляремии, для диагностики туляремии у людей. С целью рекогносцировочного обследования значительных территорий используют реакции, направленные на выявление антигенов туляремийного микроба в исследуемом материале.

Серологически исследуют материал, который не содержит живых туляремийных бактерий и непригоден для бактериологического исследования: от диких позвоночных животных, погадки хищных птиц, помет хищных млекопитающих, субстраты гнезд грызунов, почву и т. д.

На антитела к туляремийному микробу исследуют сыворотки грызунов, добытых при эпизоотологическом обследовании территории, сельскохозяйственных животных, больных или переболевших туляремией людей.

К аллергическим методам относятся:

- реакции *in vivo* – внутрикожная и накожная туляриновые пробы;
- реакции *in vitro* – лейкоцитолита, показатель повреждения нейтрофилов (ППН), бласттрансформации и др.

Экспрессные и ускоренные методы поиска антигена (РА, РНГА, РТНГА, реакции кольцепреципитации, МФА, ИФА) в исследуемом материале или антител к нему (РНат, РА, РНГА, РТНГА, кровяно-капельная реакция, МФА, ИФА), а также обнаружение специфической ДНК возбудителя (ПЦР) позволяют получить результат в течение 2–5 ч.

При использовании экспрессных и ускоренных методов диагностики получают лишь предварительный результат, который должен быть подтвержден выделением чистой культуры возбудителя туляремии.

Современные методы исследования позволяют быстро и в определенной степени надежно поставить диагноз туляремии у человека и осуществить выявление возбудителя при обследовании территорий.

2. ЛАБОРАТОРНЫЙ ДИАГНОЗ ТУЛЯРЕМИИ

ЗАНЯТИЕ 3 (6 ч)

2.1. Исследование грызунов

2.1.1. Вскрытие трупа грызуна:

- изучить патологоанатомические изменения внутренних органов, отметить их протоколе вскрытия;
- из органов трупа грызуна приготовить и исследовать мазки-отпечатки, обработанные туляремийной люминесцирующей сывороткой (прил. 2.2);
- суспензию органов (печень, селезенка) трупа грызуна исследовать в реакции кольцепреципитации (прил. 2.5);
- поставить из суспензии внутренних органов трупа грызуна индивидуальную биологическую пробу (п/к заражением белых мышей).

2.1.2. Вскрытие отловленного грызуна с патологоанатомическими изменениями во внутренних органах, характерных для туляремии:

- изучить патологоанатомические изменения во внутренних органах грызуна, отметить их в протоколе вскрытия;
- приготовить из органов грызуна и просмотреть мазки-отпечатки, окрашенные по Романовскому-Гимзе (прил. 2.1);
- посеять на среды Мак-Коя и Ft-агар лимфатический узел, кровь, печень, селезенку;
- поставить из суспензии внутренних органов грызуна индивидуальную биологическую пробу (п/к заражением белых мышей).

2.1.3. Вскрытие отловленных грызунов без патологоанатомических изменений во внутренних органах:

- поставить из суспензии внутренних органов грызунов биологическую пробу (п/к заражением белых мышей).

Примечание:

- работа по заражению и вскрытию животных проводится курсантами в лаборатории экспериментальных животных;
- методы исследования диких грызунов отрабатываются на заранее зараженных возбудителем туляремии белых мышах;
- павших биопробных животных вскрывают немедленно;
- поступивший материал на исследование регистрируют в журнале «регистрации патогенных биологических агентов, поступивших для исследования», а объекты с посевами – в журнале «движения патогенных биологических агентов».

Материал и оборудование

Труп грызуна (белая мышь)	1 шт.
Грызун с патологоанатомическими изменениями, характерными для туляремии (белая мышь)	1 шт.
Грызун без патологоанатомических изменений во внутренних органах (белая мышь)	1 шт.
Оборудованный стол для вскрытия животных	1 шт.
Стол, оборудованный для заражения	1 шт.
Биопробное животное (белая мышь)	3 шт.
Сыворотка туляремиальная люминесцирующая, разведенная до рабочего титра	1 мл
Глицерин для люм. микроскопии	0,2 мл
Краска по Романовскому-Гимзе	1 мл
Вода дистиллированная	50 мл
0,9%-й раствор хлористого натрия	100 мл
Воронка с асбестовой ватой для фильтрации экстракта	1 мл

Пробирка бактериологическая стерильная	1 мл
Пробирка Уленгута	5 шт.
Сыворотка преципитирующая туляремийная цельная	1 мл
Туляремийный антиген (стандартный, из микробов вакцинного штамма, убитых формалином)	0,5 мл
Сыворотка нормальная лошадиная цельная	0,5 мл
Среда Мак-Коя	4 пробирки
Ft-агар	4 пробирки
Пипетка стерильная на 1 или 2 мл	1 шт.
Пипетка пастеровская	6 шт.
Предметное стекло	2 шт.
Покровное стекло	1 шт.
Фиксатор (96°-й спирт)	150 мл
Стакан для промывания мазков	3 шт.
Кристаллизатор для промывания мазков	1 шт.
Набор для окрашивания мазков по Граму	1 шт.
Иммерсионное масло	0,1 мл
Нефлуоресцирующее иммерсионное масло	0,1 мл
Микроскоп световой	1 шт.
Микроскоп люминесцентный	1 шт.
Термостат на 37 °С	1 шт.

2.2. Исследование воды

2.2.1. Вскрытие морской свинки, зараженной подкожно исследуемой водой:

- изучить патологоанатомические изменения во внутренних органах, заполнить протокол вскрытия;
- приготовить из внутренних органов морской свинки и исследовать мазок-отпечаток, обработанный туляремийной люминесцирующей сывороткой (прил. 2.2);
- посеять печень, селезенку и паховый лимфатический узел на среды Мак-Коя и Ft-агар.

Примечание:

- морскую свинку курсанты заражают исследуемой водой заранее с учетом сроков гибели;
- посева регистрируют в журнале движения патогенных биологических агентов.

Материал и оборудование

Среда Мак-Коя	3 пробирки
Ft-агар	3 пробирки
Сыворотка туляреминая люминесцирующая, разведенная до рабочего титра	1 мл
Пастеровская пипетка	1 шт.
Оборудованный стол для вскрытия животных	1 шт.
Фиксатор (96°-й спирт)	150 мл
0,9%-й раствор хлористого натрия	100 мл
Дистиллированная вода	50 мл
Глицерин для микроскопии	0,2 мл
Предметное стекло	1 шт.
Покровное стекло	1 шт.
Стакан для промывания мазков	3 шт.
Нефлуоресцирующее иммерсионное масло	0,1 мл
Микроскоп люминесцентный	1 шт.
Термостат на 37 °С	1 шт.

ЗАНЯТИЕ 4 (2 ч)**2.3. Продолжение исследования грызунов. Выделение чистой культуры**

2.3.1 Просмотреть посевы на средах МакКоя и Ft-агаре.

2.3.2. Отобрать подозрительную на туляремию культуру, проверить ее мазком, окрашенным по Граму, и в ОРА с туляреминой диагностической сывороткой 1:10. Пересеять на две пробирки каждой среды: Мак-Коя, Ft-агар и скошенного МПА.

Материал и оборудование

Сыворотка диагностическая туляреминая 1 : 10	0,5 мл
Среда Мак-Коя	2 пробирки
Ft-агар	2 пробирки
МПА	2 пробирки
Пипетка пастеровская	1 шт.
Предметное стекло	1 шт.
Фиксатор (96°й спирт)	150 мл
Кристаллизатор для промывания мазков	1 шт.

Набор для окрашивания мазков по Граму	1 шт.
Иммерсионное масло	0,1 мл
Микроскоп световой	1 шт.
Термостат на 37 °С	1 шт.

2.4. Продолжение исследования воды. Выделение чистой культуры

2.4.1. Просмотреть посевы на средах МакКоя и Ft-агаре.

2.4.2. Отобрать культуру, подозрительную на туляремию, проверить ее мазком, окрашенным по Граму, и в ОРА с туляремийной диагностической сывороткой 1:10, пересеять на две пробирки каждой среды: Мак-Коя, Ft-агар и скошенного МПА.

Материал и оборудование

Предметное стекло	1 шт.
Фиксатор (96°-й спирт)	150 мл
Сыворотка диагностическая туляремийная 1 : 10	0,5 мл
Среда Мак-Коя	2 пробирки
Ft-агар	2 пробирки
МПА	2 пробирки
Кристаллизатор для промывания мазков	1 шт.
Набор для окрашивания мазков по Граму	1 шт.
Иммерсионное масло	0,1 мл
Микроскоп световой	1 шт.
Пипетка пастеровская	1 шт.
Термостат на 37 °С	1 шт.

ЗАНЯТИЕ 5 (3 ч)

2.5. Продолжение исследования грызунов.

Идентификация культуры

2.5.1. Просмотреть посевы на средах Ма-Коя и Ft-агаре.

2.5.2. Проверить чистоту роста культуры мазком, окрашенным по Граму.

2.5.3. Отметить отсутствие роста на скошенном МПА.

2.5.4. Поставить развернутую РА с выделенной культурой и туляремийной диагностической сывороткой 1:50 (прил. 2.4).

2.5.5. Посеять выделенную культуру в пробирку со средой Мак-Коя, скошенного агара с глицерином, средой с цитруллином (прил. 1.4, 1.5).

2.5.6. Посеять выделенную культуру на чашку со средой для определения чувствительности к эритромицину (прил. 2.3).

Примечание:

- окончательный учет результатов развернутой РА с туляремийной диагностической сывороткой производят через 18–24 ч.

Материал и оборудование

Предметное стекло	1 шт.
Фиксатор (96°-й спирт)	150 мл
Кристаллизатор для промывания мазков	1 шт.
Набор для окрашивания мазков по Граму	1 шт.
Иммерсионное масло	0,1 мл
Микроскоп световой	1 шт.
Среда Мак-Коя	1 пробирка
Ft-агар	1 чашка Петри
Среда с глицерином	1 пробирка
Среда с цитруллином (2 мл)	1 пробирка
Иммерсионное масло	0,1 мл
Сыворотка диагностическая туляремийная 1 : 50	2 мл
0,9%-й раствор хлористого натрия	5 мл
Пробирка бактериологическая для РА	10 шт.
Пипетка стерильная на 1 или 2 мл	3 шт.

2.6. Продолжение исследования воды. Идентификация культуры

2.6.1. Просмотреть посеvy на средах Мак-Коя и Ft-агаре.

2.6.2. Отметить отсутствие роста на скошенном МПА.

2.6.3. Проверить чистоту роста культуры мазком, окрашенным по Граму.

2.6.4. Поставить развернутую РА с выделенной культурой и туляремийной диагностической сывороткой 1:50 (прил. 2.4).

Примечание:

- окончательный учет результатов развернутой РА с туляремийной диагностической сывороткой производят через 18–24 ч.

Материал и оборудование

Предметное стекло	1 шт.
Фиксатор (96°-й спирт)	150 мл
Кристаллизатор для промывания мазков	1 шт.
Набор для окрашивания мазков по Граму	1 шт.
Иммерсионное масло	0,1 мл
Микроскоп световой	1 шт.
Сыворотка диагностическая туляремийная 1 : 50	2 мл
0,9%-й раствор хлористого натрия	5 мл
Пробирка бактериологическая для РА	10 шт.
Пипетка стерильная на 1 или 2 мл	2 шт.

ЗАНЯТИЕ 6 (2 ч)

2.7. Окончание исследования грызунов и воды

2.7.1. Просмотреть посевы на среде Мак-Коя, скошенном агаре с глицерином, на среде с цитруллином.

2.7.2. Проверить чистоту роста культуры мазком, окрашенным по Граму.

2.7.3. Отметить чувствительность выделенной культуры к эритромицину.

2.7.4. Заполнить паспорт на выделенные культуры (прил. 6).

Примечание:

- передать все имеющиеся посевы культур, выделенных от грызунов и из воды, для обеззараживания;
- составить акт на уничтожение культур;
- провести записи в журнале движения патогенных биологических агентов и в журнале регистрации патогенных биологических агентов, поступивших для исследования.

Материал и оборудование

Предметное стекло	1 шт.
Фиксатор (96°-й спирт)	150 мл
Кристаллизатор для промывания мазков	1 шт.
Набор для окрашивания мазков по Граму	1 шт.
Иммерсионное масло	0,1 мл
Микроскоп световой	1 шт.

3. СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ НА ТУЛЯРЕМИЮ

ЗАНЯТИЕ 7 (3 ч)

3.1. Серологическая диагностика туляремии у человека

3.1.1. Поставить развернутую РА с сывороткой больного и туляре-
мийным диагностикумом (прил. 3.2).

Примечание:

- окончательный учет результатов развернутой РА с туляреми-
йным диагностикумом производят через 18–24 ч.

Материал и оборудование

Исследуемая сыворотка больного в разведении 1 : 10	2 мл
Туляреминый диагностикум стандартный в концентрации 5 млрд. м.кл./мл	5 мл
0,9%-й раствор хлористого натрия	5 мл
Пробирка бактериологическая для РА	10 шт.
Пипетка стерильная на 1 или 2 мл	5 шт.

3.1.2. Поставить РНГА и РТНГА с сывороткой больного и туляреми-
йным эритроцитарным антигенным диагностикумом (прил. 3.3, 3.4).

Примечание:

- учет результатов РНГА и РТНГА с туляреми-
йным эритроцитарным антигенным диагностикумом производят через 2 ч.

Материал и оборудование

Исследуемая сыворотка больного в разведении 1 : 10	1 мл
НКС 1%-й	2 мл
Диагностикум туляреминый эритроцитарный антигенный 0,5%-й	2 мл
Эритроциты несенсибилизированные 0,5 %	0,5 мл
Туляреминый диагностикум в концентрации 5×10^8 м.кл./мл	1 мл
Автоматическая пипетка	1 шт.
Наконечники	4 шт.
Полистироловая пластина	1 шт.

3.1.3. Поставить кровяно-капельную РА с кровью больного и туля-
реми-йным диагностикумом (прил. 3.1).

Материал и оборудование

Исследуемая кровь больного	0,5 мл
Диагностикум туляреминый цельный	0,5 мл
Вода дистиллированная (рН 7,2)	0,5 мл
Чашка Петри	1 шт.

3.2. Исследование погадок хищных птиц

3.2.1. Определить две минимальные сывороточные единицы (2 СЕ) туляреминой диагностической сыворотки и поставить РНАт с материалом из погадок хищных птиц и туляреминым эритроцитарным антигенным диагностикумом (прил. 2.6).

Примечание:

- погадки хищных птиц курсанты получают предварительно подготовленными к исследованию.

Материал и оборудование

Сыворотка диагностическая туляреминая 1 : 10000	0,5 мл
НКС 1%-й	5 мл
Диагностикум туляреминый эритроцитарный антигенный 0,5 %-й	2 мл
Эритроциты несенсибилизированные 0,5 %	0,5 мл
Сыворотка диагностическая туляреминая 2 СЕ	1 мл
Диагностикум туляреминый эритроцитарный антигенный 0,5 %-й	1 мл
Исследуемый материал из погадок хищных птиц	0,5 мл
Автоматическая пипетка	1 шт.
Наконечники	4 шт.
Полистироловая пластина	1 шт.

ЗАНЯТИЕ 8 (3 ч)

3.3. Окончание исследования погадок хищных птиц

3.3.1. Учет РНАт с материалом из погадок хищных птиц.

3.4. Аллергические методы исследования на туляремию

3.4.1. Исследовать кровь больного на туляремию в реакции лейкоцитолита (прил. 4.1).

Материал и оборудование

Исследуемая кровь больного	0,5 мл
Цитрат натрия 5%-й раствор	0,5 мл
Тулярин цельный (10 млрд. убитых бактерий в 1 мл)	0,5 мл
0,9%-й раствор хлористого натрия	0,5 мл
Кислота уксусная 3%-я, подкрашенная метиленовой синькой до светло-голубого цвета	1 мл
Микропипетка	2 шт.
Камера Горяева	1 шт.
Полистироловая пластина	1 шт.

III. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Одним из основных генетических методов, используемых в настоящее время при исследовании на туляремию, является полимеразная цепная реакция (ПЦР). Она дает возможность с высокой надежностью и в максимально сжатые сроки определить наличие возбудителя в пробах и начать своевременное проведение противоэпидемических мероприятий.

Сущность полимеразной цепной реакции состоит в избирательной амплификации определенных последовательностей, присутствующих в исследуемой ДНК. ПЦР представляет собой многократно повторяющиеся циклы синтеза (амплификацию) специфической области ДНК-мишени в присутствии термостабильной ДНК-полимеразы, соответствующего солевого буфера, дезоксинуклеозидтрифосфатов и олигонуклеотидных затравок-праймеров, определяющих границы амплифицируемого участка ДНК-мишени. Реакцию проводят циклически, многократно (на протяжении 25–40 циклов), повторяя три этапа реакции в приборе, называемом термоциклером. В каждом цикле происходит удвоение числа копий амплифицируемого участка, что позволяет наработать фрагмент ДНК, ограниченный парой выбранных праймеров, в количестве, достаточном для ее детекции с помощью электрофореза. В настоящее время для постановки ПЦР используют генодиагностические препараты, в основе которых лежит амплификация *iglABCD*, *tul4* или других видоспецифичных генов туляремийного микроба. К таким препаратам относятся тест-системы для выявления ДНК *F. tularensis* методом ПЦР. Наборы реагентов «Ген *Francisella tularensis*-РЭФ» и «Ген *Francisella tularensis* – РФ» (производства ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»), «ОМ-Скрин Туляремия-РФ» (ЗАО

«Синтол»), а также набор реагентов для выявления ДНК возбудителей чумы, сибирской язвы и туляремии методом ПЦР в режиме реального времени «MULTI-FLU» (ГНЦ ПМБ Оболенск).

Не допустимо применение для генной диагностики туляремии праймеров, комплементарных гену *16 S* рРНК и гену *lpn*, кодирующему синтез предшественника мембранного белка молекулярной массы 17 kD. Это связано с тем, что установлена высокая гомология этих генов у туляремийного микроба и *F. philomiragia*, *Wolbachia persica* и других эндосимбионтов клещей родов *Amblyomma*, *Ornithodoros* и *Dermacentor*.

Работу выполняют в соответствии с методическими указаниями МУ 1.3.7569–09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

К исследуемым образцам добавляют мертиолят натрия до конечной концентрации 1:10000 (0,01 %) с последующим прогреванием их при 56 °С в течение 30 мин. После обработки мертиолятом натрия 100 мкл образца переносят в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл, добавляют лизирующий раствор на основе 6М гуанидинтиоизоцианата в объеме, указанном в инструкции к тест-системе, и инкубируют 15 мин при температуре 65 °С. После выполнения данного этапа материал считается обеззараженным.

Выделение ДНК, проведение ПЦР и учет результатов осуществляют в соответствии с инструкцией по применению (приложение п. 5).

Выявление фрагмента, соответствующего по размеру фрагменту положительного контроля, или наличие в пробе специфической флуоресценции по соответствующим каналам указывает на наличие в пробе ДНК туляремийного микроба.

ЗАНЯТИЕ 9 (5 ч)

4. Исследование материала для выявления ДНК возбудителя туляремии с использованием ПЦР.

Занятие включает три последовательных этапа, которые выполняются в течение одного полного учебного дня (приложение п. 5).

Материал и оборудование

Термоциклер с програмн. обеспечением МС-2 или аналогичный	1 шт.
Термостат с регулируемым диапазоном температур от 5 до 80 °С	1 шт.
Встряхиватель V-4 типа вортекс	1 шт.
Микроцентрифуга для пробирок типа Eppendorf – CM-50 (12 тыс. об/мин)	1 шт.

Аппарат для проведения горизонтального гель-электрофореза	1 шт.
Источник напряжения постоянного тока	1 шт.
УФ-трансиллюминатор	1 шт.
Микродозаторы «Ленпипет», Россия, 1–20, 20–200, 200–1000 мкл	3 шт.
Баня водяная, максимальная температура 100 °С	1 шт.
Микроцентрифужные пробирки типа Eppendorf на 0,5 и 1,5 мл	по 3 шт.
Наконечники для микродозаторов разного объема	по 10 шт.
Лабораторный штатив ТУ 64-17-07-72	2 шт.
Колбы мерные на 50, 100, 200 мл	по 1 шт.
Пробирки ГОСТ 10-515-75	10 шт.
Цилиндры мерные на 25, 100, 1000 мл	по 1 шт.
Пипетки мерные ГОСТ 20292-74	5 шт.

IV. ВРЕМЯПРОЛЕТНАЯ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ С МАТРИЧНО-АКТИВИРОВАННОЙ ЛАЗЕРНОЙ ДЕСОРБЦИЕЙ/ИОНИЗАЦИЕЙ (MALDI-TOF MS) ДЛЯ ИНДИКАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУЛЯРЕМИИ

Масс-спектрометрический анализ (МС-анализ) является аналитической процедурой, физическим методом исследования, в процессе которого осуществляется измерение отношения массы заряженных частиц материи (ионов) к их заряду. Полученный результат – спектральный сигнал – представляет собой рассортировку заряженных частиц по значению отношения молекулярной массы иона к его заряду.

Использование в качестве исследуемого образца чистой культуры микроорганизма или его экстрактов позволяет получить спектр, характеризующий качественный молекулярный состав исследуемого объекта. Получаемый спектральный паттерн является уникальной видо-, а в некоторых случаях и штаммоспецифичной характеристикой, позволяющей однозначно идентифицировать микроорганизм до вида, а в некоторых случаях осуществить и внутривидовую дифференциацию или определить дополнительные свойства микроорганизма, в том числе и клинически значимые.

Собранные в процессе анализа спектры исследуемых микроорганизмов могут сравниваться с референсными спектрами, присутствующими в базе данных, поставляемых производителями вместе

с оборудованием для MALDI-ToF MS. При определенном проценте совпадений выводится результат о таксономической принадлежности исследуемого объекта.

Работу выполняют в соответствии с методическими рекомендациями МР 4.2.0089-14 «Использование метода времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS) для индикации и идентификации возбудителей I–II групп патогенности».

Культивирование проводят на чашках с FT-агаром (прилож. 1) в течение 72 ч при температуре 37 °С. Культуры возбудителя для масс-спектрометрического исследования подвергают предварительной экстракции белка перед нанесением на чип (мишень).

Материал и оборудование

MALDI-ToF масс-спектрометр MicroFlex (Bruker Daltonik GmbH) или эквивалент	1 шт.
MSP-мишень (Чип) для нанесения образцов, 96-луночная (Bruker Daltonik GmbH или эквивалент)	1 шт.
Бокс биологической безопасности II класса тип В	1 шт.
Термостат для температурного режима 37 °С	1 шт.
Термостат для температурного режима 28 °С	1 шт.
Лабораторная настольная центрифуга с ротором для микропробирок объемом 1,5 мл, до 13 000 об./мин	1 шт.
Микроцентрифуга-встряхиватель	1 шт.
Дозатор механический одноканальный 0,5–10 мкл	1 шт.
Дозатор механический одноканальный 10–100 мкл	1 шт.
Наконечники для механического дозатора, 0,1–10 мкл	1 штатив
Наконечники для механического дозатора, 10–100 мкл	1 штатив
Наконечники для механического дозатора, 100–1 000 мкл	1 штатив
Петля бактериологическая	1 шт.

Проведение экстракции:

1. Готовят и маркируют необходимое число микропробирок, соответствующее числу исследуемых штаммов.
2. В каждую пробирку вносят 300 мкл деионизованной воды.
3. Микробиологической петлей диаметром 1 мм в пробирку вносят одну изолированную колонию возбудителя и плавными движениями суспендируют.
4. К суспензии добавляют 900 мкл 96%-го этилового спирта.
5. Полученную смесь тщательно перемешивают на микроцентрифуге-вортексе.

6. После перемешивания пробирки помещают в центрифугу (необходимо сохранять ориентацию пробирок после помещения их в ротор) и центрифугируют в течение 2 мин при 13 тыс. об./мин.

7. Полученный супернатант аккуратно, не задевая осадка, отбирают одноразовым наконечником и сливают в емкость с дезинфицирующим раствором.

8. Этапы 6 и 7 повторяют для удаления остатков раствора этанола.

9. К осадку добавляют 25 мкл 70%-го водного раствора муравьиной кислоты, полученную смесь тщательно перемешивают пипетированием или на микроцентрифуге-вортексе (объем муравьиной кислоты зависит от первоначального количества культуры, взятой в исследование, и может варьировать от 1 до 80 мкл).

10. К суспензии добавляют равный объем ацетонитрила и смесь повторно тщательно перемешивают.

11. После перемешивания пробирки помещают в центрифугу (необходимо сохранять ориентацию пробирок, после помещения их в ротор) и центрифугируют в течение 2 мин при 13 тыс. об./мин.

12. В лунку MSP-чипа вносят 1 мкл полученного супернатанта. Для каждой исследуемой единицы (колония, штамм) используют 5 лунок для получения достоверного результата.

13. Сразу после высыхания нанесенной на чип капли супернатанта сверху наносят 1 мкл матрицы (прилож. 3, 5).

14. В лунку H12 MSP-чипа вносят 1 мкл калибровочного стандарта для масс-спектрометрии, на который также после высыхания наносят 1 мкл матрицы. Необходимо дождаться высыхания раствора матрицы, после чего можно приступить к масс-спектрометрическим исследованиям.

15. После проведения мероприятий по заключительной дезинфекции рабочей зоны бокса 70% спиртом чип с нанесенными на него образцами может быть перенесен в «чистую» зону для дальнейшего анализа.

ПРИЛОЖЕНИЕ

1. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ СВОЙСТВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУЛЯРЕМИИ

1.1. Среда Мак-Коя

Свежие куриные яйца тщательно моют щеткой с мылом в теплой воде, обтирают спиртом и быстро обжигают в пламени горелки. Яйцо разбивают, отделяют желток от белка. Желток помещают в стерильный градуированный сосуд и смешивают с физиологическим раствором (рН 7,0–7,2) в соотношении: 60 % желтка и 40 % физиологического раствора. Полученную смесь разливают стерильной пипеткой по 5 мл в стерильные бактериологические пробирки и свертывают в аппарате Коха в наклонном положении при 80 °С в течение часа. Правильно приготовленная желточная среда должна иметь конденсационную жидкость.

Для проверки стерильности среды ее помещают на сутки в термостат при 37 °С. Готовая среда хранится в холодильнике при 4 °С и используется в течение месяца с момента приготовления.

1.2. Ft-агар

Ft-агар состоит из основы, глюкозо-витаминной добавки (далее – ГВД) и селективной добавки (далее – СД).

Приготовление основы.

Навеску основы Ft-агара в количестве, указанном на этикетке, растворяют в 970 мл дистиллированной воды и стерилизуют в автоклаве при температуре (120 ± 1) °С в течение 15 мин, затем охлаждают до температуры 50–45 °С.

Приготовление раствора ГВД.

6,0 г ГВД растворяют в 20 мл дистиллированной воды и стерилизуют при температуре 110 °С в автоклаве в течение 30 мин.

Приготовление раствора СД.

Содержимое флакона с СД растворяют в 10 мл стерильной дистиллированной воды.

Приготовление готовой питательной среды.

В колбу с охлажденным до температуры 50–45 °С раствором основы асептически вносят 20 мл раствора ГВД, 10 мл раствора СД, все тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри (допускается селективную добавку не вносить при приготовлении среды для культивирования).

Готовую питательную среду можно использовать в течение 5 суток при условии ее хранения при температуре (8 ± 2) °С.

Ft-агар обеспечивает рост возбудителя туляремии в виде беловато-серых блестящих колоний диаметром не менее 1 мм через 72 ч инкубации при температуре (37 ± 1) °С при посеве единичных клеток и в виде газона через 48 ч инкубации при большой посевной дозе.

1.3. Питательная среда с антибиотиком

Для приготовления среды с антибиотиком используют любую питательную среду для выращивания туляремиального микроба. Антибиотик наносят *ex tempore* на поверхность питательной среды или добавляют непосредственно в среду перед разливом. На поверхность питательной среды наносят антибиотик в объеме 0,1 мл (с содержанием пенициллина или ампициллина 100 ед/мл). Наиболее эффективным является добавление в среду двух антибиотиков: ампициллина 50 ед/мл и полимиксина 100 мкг/мл.

1.4. Среда для определения ферментации глицерина

К 100 мл МПА, расплавленного и остуженного до 45 °С добавляют 0,05 г цистина, предварительно растворенного в 10%-м едком натрии, бромтимолблау 1%-й – 0,4 мл и 1 мл чистого глицерина. Цвет среды должен быть зеленым. Среду стерилизуют в автоклаве при 112–115 °С в течение 20 мин, охлаждают до 50 °С, добавляют 5 % нормальной лошадиной сыворотки, устанавливают рН 7,0–7,2, разливают по пробкам и скашивают.

На среду засевают 2–3 полные стандартные бактериологические петли 2-суточной агаровой культуры. Глицеринположительные штаммы вызывают пожелтение среды. Глицеринотрицательные штаммы окрашивают среду в сине-зеленый цвет.

1.5. Среда для определения цитруллинуреидазной активности

К 100 мл дистиллированной воды добавляют 100 мл сухого пептона, 500 мг NaCl, 30 мг K₂HPO₄, 20 мг цистеина, 2 фенолового красного и 200 мг Dl-цитруллина. Смесь подогревают на водяной бане до полного

растворения составных частей, устанавливают рН 7,2 и автоклавируют при 112–115 °С в течение 30 мин. Среду разливают в пробирки по 2 мл. Готовая среда имеет светло-коричневую окраску.

На среду засевают полную стандартную бактериологическую петлю 1–2-суточной культуры со среды Мак-Коя, инкубируют при 37 °С в течение 2–3 суток. Штаммы, обладающие цитрул-линуреидазой, меняют цвет среды в ярко-красный (малиновый). Контролем служит среда без цитруллина (основа).

2. МЕТОДИКИ ИЗУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУЛЯРЕМИИ

2.1. Окраска мазков-отпечатков по Романовскому–Гимзе

После 40–60 мин фиксации в 96° этиловом спирте мазок окрашивают по Романовскому–Гимзе. Раствор краски готовят из расчета 3–4 капли на 1 мл дистиллированной воды (рН 7,0–7,2). Окрашивание продолжается не менее 1 ч (можно до 24 ч). В правильно окрашенном мазке бактерии туляремии имеют сиреневатый цвет и легко определяются по размерам, форме и скученному расположению.

Для ускоренной окраски мазков применяют метод, основанный на одновременной фиксации и окраске мазков. На мазок наносят 20 капель краски Романовского–Гимзе, смешанной в равных частях с метиловым спиртом или химически чистым ацетоном. Через одну минуту к краске приливают 10 мл подщелоченной (рН 7,2) дистиллированной воды. Осторожным покачиванием краску смешивают с водой. Через 10–15 мин краску сливают, мазок промывают водопроводной водой, высушивают и микроскопируют.

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

2.2. Исследование мазков-отпечатков из органов животных люминесцентно-серологическим методом (МФА)

Мазки-отпечатки из органов животных готовят обычным способом на тщательно обезжиренном предметном стекле, подсушивают на воздухе, фиксируют в течение 40–60 мин в 96° спирте и обрабатывают флуоресцирующей сывороткой во влажной камере в течение 15–20 мин при 37 °С. Затем мазок промывают физиологическим раствором рН 7,2 в течение 10 мин в стеклянных стаканах, ополаскивают дистиллированной водой и подсушивают на воздухе.

Перед просмотром на препарат наносят небольшую каплю забуференного глицерина, накрывают его покровным стеклом. На покровное стекло наносят каплю нефлуоресцирующего масла или химически чистого диметилфталата. Препарат просматривают в люминесцентном микроскопе.

С целью «гашения» неспецифического свечения мазки-отпечатки обрабатывают специфической флуоресцирующей сывороткой в смеси с бычьим альбумином, меченным родамином. При микроскопии таких препаратов на оранжево-красном фоне обнаруживают светящиеся зелено-желтые микроорганизмы с ярким свечением по периферии клетки и слабым в ее центральной части. Интенсивность свечения микроорганизмов оценивают по шкале:

«++++» – очень яркое свечение, морфология клетки хорошо различима;

«+++» – свечение менее яркое, морфология клетки хорошо различима;

«++» – свечение слабое, морфология клеток различается с трудом;

«+» – очень слабое свечение, морфология клеток не различима.

Специфическим считается свечение на 4+ и 3+.

2.3. Определение чувствительности выделенной культуры к эритромицину

Для определения чувствительности выделенной культуры к эритромицину готовят суспензию культуры в концентрации 10^9 м.к./мл по оптическому стандарту мутности. 0,3–0,5 мл суспензии равномерно распределяют покачиванием по поверхности среды Ft-агара и подсушивают. В центр чашки накладывают диск с эритромицином, содержащий 15 мкг антибиотика. Результат учитывают через 2 суток инкубирования при 37 °С.

Культура, чувствительная к эритромицину (I биовар) дает выраженную зону задержки роста вокруг диска. Культура, резистентная к эритромицину (II биовар), равномерно растет по всей поверхности чашки.

2.4. Реакция агглютинации для идентификации культуры (табл. 3)

Берут исходное разведение туляремийной диагностической сыворотки 1:50 и титруют в физиологическом растворе в объеме 0,5 мл до титра сыворотки, начиная со второй пробирки. Из последней опытной пробирки 0,5 мл сыворотки удаляют для сохранения одинакового объема. Затем в каждое разведение сыворотки добавляют по 0,5 мл взвеси исследуемой культуры, соответствующей 10 ед. (ОСО 42–28–85П). Одновременно ставят контроли:

- контроль антигена: 0,5 мл физиологического раствора + 0,5 мл взвеси исследуемой культуры;
- контроль сыворотки: 0,5 мл физиологического раствора + 0,5 мл рабочего разведения сыворотки (1 : 50).

Таблица 3

Реакция агглютинации для идентификации культуры

Ингредиенты, мл	№ пробирки						Контроли	
	1	2	3	4	5	6	анти-гена	сыво-ротки
Физиологический раствор	–	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Сыворотка диагностическая туляремийная 1 : 50	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	–	0,5
Суспензия бактерий в 10 ед.	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	–
Полученное разведение сыворотки	1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 800	1 : 1600	1 : 3200	–	1 : 100

Штатив с пробирками тщательно встряхивают и помещают в термостат при 37 °С на 2 ч, после чего проводят предварительный учет. Затем реакцию оставляют на 18–24 ч при комнатной температуре и проводят окончательный учет результатов по шкале:

«++++» – полная агглютинация, хлопья агглютината в виде зонтика на дне абсолютно прозрачной жидкости;

«+++» – неполная агглютинация, хлопья агглютината на дне в виде зонтика и слабо опалесцирующая жидкость;

«++» – частичная агглютинация, хлопья различимы, жидкость слегка мутная;

«+» – сомнительная агглютинация, жидкость мутная, агглютинат плохо различим;

«–» – отсутствие агглютинации, жидкость равномерно мутная.

РА учитывают как положительную при наличии отчетливой агглютинации в опытных пробирках не менее 3+ до титра или до половины титра и отсутствии агглютинации в обеих контрольных пробирках.

2.5. Реакция кольцепреципитации (табл. 4).

Для постановки реакции необходимо иметь преципитирующую туляремию сыворотку, антиген, экстрагированный из исследуемого материала, туляреминый антиген (для контроля), нормальную сыворотку и физиологический раствор.

Четкую реакцию получают, если 1 мл экстракта содержит не менее 2500 млн. м.к. Кусочки органов (печень, селезенка) весом до 1 г растирают в ступке, добавляют 3 мл физиологического раствора, суспендируют и переносят в стерильную бактериологическую пробирку. Затем полученную суспензию кипятят в течение 15–20 мин на водяной бане и фильтруют через асбестовую вату до получения прозрачного экстракта. Мутный экстракт для постановки реакции не пригоден.

Техника постановки реакции

В пробирку Уленгута вносят 0,2 мл преципитирующей сыворотки и осторожно, по внутренней стенке пробирки, наслаивают пастеровской пипеткой с тонко оттянутым капилляром исследуемый экстракт. В момент наслаивания пробирку с сывороткой фиксируют в наклонном положении (под углом примерно 45°).

После наслаивания АГ пипетку извлекают, не отрывая от стенки пробирки. Пробирку переводят в вертикальное положение. К каждому опыту ставится ряд контролей. При положительной реакции на границе соприкосновения жидкостей образуется белое кольцо не позднее, чем через 15 мин. Если кольцо отсутствует, то реакция оценивается как отрицательная.

Таблица 4

Реакция кольцепреципитации

Ингредиенты, мл	Опыт	Контроли		
		1	2	3
Специфическая преципитирующая сыворотка	0,2	0,2	0,2	–
Нормальная сыворотка (того же вида животного)	–	–	–	0,2
Исследуемый экстракт	0,2	–	–	0,2
Туляреминый антиген	–	0,2	–	–
0,9%-й хлористый натрий	–	–	0,2	–
Результат	+(-)	+	–	

2.6. Реакция нейтрализации антител (табл. 5, 6)

РНат применяют для поиска туляремийного антигена. Реакция высокоспецифична, выявляет возбудителя туляремии при содержании его в исследуемом материале не менее чем 10^6 м.к./мл. Перед постановкой РНат определяют 2 сывороточные единицы (СЕ) (табл. 5).

Таблица 5

Определение 2 СЕ

Ингредиенты, мкл	№ лунки								Контроль диагностикума	
	1	2	3	4	5	6	7	8		
Разводящая жидкость	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Сыворотка диагностическая туляремийная 1 : 1000									↗	—
0,5%-й туляремийный эритроцитарный антигенный диагностикум	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Полученное разведение сыворотки	1 : 20	1 : 40	1 : 80	1 : 160	1 : 320	1 : 640	1 : 1280	1 : 2560	—	—

В ряд лунок микротитровальной пластины вносят по 50 мкл разводящей жидкости (НКС 1 %). Затем автоматической пипеткой вносят и титруют туляремийную диагностическую сыворотку в разведении 1:1000. После чего в каждое разведение сыворотки вносят по 25 мкл 0,5% туляремийного эритроцитарного антигенного диагностикума. Пластину встряхивают и оставляют на 2 ч при комнатной температуре, после чего производят учет реакции. Последнее разведение сыворотки, давшее четкую агглютинацию эритроцитов, принимают за 1 СЕ, а предыдущую лунку за 2 СЕ.

Для постановки РНат (табл. 6) в ряд лунок микротитровальной пластины вносят 25 мкл разводящей жидкости (НКС 1 %). Затем автоматической пипеткой вносят в первую лунку 25 мкл исследуемого материала и титруют в том же объеме. Из последней лунки удаляют 25 мкл жидкости для сохранения одинакового объема. После этого в каждую лунку добавляют по 25 мкл туляремийной диагностической сыворотки в 2 СЕ. Пластину встряхивают и оставляют на 1 ч при ком-

натной температуре, затем во все лунки добавляют по 25 мкл 0,5%-го туляремийного эритроцитарного антигенного диагностикума (т.е. разведенного в 5 раз). Пластины осторожно встряхивают и оставляют на 2 ч при комнатной температуре, после чего учитывают результаты реакции.

Таблица 6

Реакция нейтрализации антител (РНАт)

Ингредиенты, мкл	№ лунки								Контроли	
	1	2	3	4	5	6	7	8	иссле- дуемого материала	диагно- стикума
Разводящая жидкость	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Исследуемый материал	25	25	25	25	25	25	25	25	25	–
Туляремийная диагностическая сыворотка 2 СЕ	25	25	25	25	25	25	25	25	–	–
Пластины оставляют на 1 ч при комнатной температуре										
0,5%-й туляремийный эритроцитарный антигенный диагностикум	25	25	25	25	25	25	25	25	–	25
0,5%-е несенсибилизиро- ванные эритроциты	–	–	–	–	–	–	–	–	25	–

За титр реакции принимают последнее разведение исследуемого материала, в котором отмечено полное подавление гемагглютинации, т. е. эритроциты выпадают на дно лунки в виде «пуговки» или узкого колечка.

К реакции предусматривают контроль исследуемого материала: 25 мкл разводящей жидкости + 25 мкл исследуемого материала + 25 мкл 0,5%-х несенсиблизованных эритроцитов. Контроль должен дать четко отрицательную реакцию.

Погадки хищных птиц для исследования в РНАт измельчают пестиком в фарфоровой ступке, заливают подогретым до 70 °С физиологическим раствором (рН 7,2) в соотношении 1 : 5, настаивают 30 мин. Затем пипеткой через ватный тампон отбирают жидкость из ступки

в пробирку. Пробирки с исследуемым материалом прогревают в течение 10–15 мин на кипящей водяной бане. Материал фильтруют до получения прозрачного экстракта и исследуют серологически.

3. СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ, НАПРАВЛЕННЫЕ НА ВЫЯВЛЕНИЕ АНТИТЕЛ В СЫВОРОТКЕ БОЛЬНОГО

3.1. Кровяно-капельная реакция

Реакцию применяют для экспрессной серологической диагностики туляремии у людей. В качестве антигена используют туляремийный диагностикум из микробов вакцинного штамма, убитых формалином (1 мл диагностикума содержит 25 млрд. м. кл.).

В чашке Петри смешивают каплю исследуемой крови и каплю дистиллированной воды для получения гемолиза эритроцитов. Затем к крови добавляют каплю диагностикума и перемешивают. Реакция агглютинации наступает немедленно, если в сыворотке крови больного содержатся антитела с диагностическим титром 1:100 и выше. Реакция бывает слабо выраженной и появляется в течение 5 мин, если в сыворотке крови больного содержатся антитела в более низком титре (1:50).

3.2. Реакция агглютинации на обнаружение антител к туляремийному микробу в сыворотке больного (табл. 7)

Таблица 7

Реакция агглютинации для обнаружения антител к туляремийному микробу

Ингредиенты, мл	№ пробирки						Контроли	
	1	2	3	4	5	6	сыво- ротки	диагнос- тикума
Физиологический раствор	–	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Исследуемая сыворотка больного в разведении 1 : 10	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	–
Туляремийный диагностикум в концентрации 5 млрд. м.кл./мл	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	–	0,5
Полученное разведение сыворотки	1 : 20	1 : 40	1 : 80	1 : 160	1 : 320	1 : 640	1 : 20	

Исходное разведение сыворотки больного (1:10) последовательно титруют в физиологическом растворе в объеме 0,5 мл, начиная со второй пробирки. Из последней пробирки 0,5 мл сыворотки удаляют для сохранения одинакового объема. Во все пробирки добавляют по 0,5 мл туляреминого диагностикума в концентрации 5 млрд. туляреминых бактерий в 1 мл (т. е. разведенного в 5 раз).

К реакции предусматривают контроли:

- контроль антигена: 0,5 мл физиологического раствора + 0,5 мл диагностикума в рабочем разведении;
- контроль сыворотки: 0,5 мл физиологического раствора + 0,5 мл исходного разведения сыворотки (1:10).

Штатив с пробирками встряхивают и помещают в термостат при 37 °С на 2 ч, после чего производят предварительный учет. Затем реакцию оставляют при комнатной температуре на 18–24 ч и проводят окончательный учет по общепринятой четырехбалльной шкале.

Реакция считается положительной, если агглютинация наступает в разведении 1:100 и выше (диагностический титр). При этом в пробирке обнаруживают значительное просветление жидкости и образование ясно видимого осадка в виде «зонтика».

3.3. Реакция непрямой гемагглютинации (табл. 8)

РНГА с туляреминым эритроцитарным антигенным диагностикумом применяют для выявления специфических антител в сыворотке больного. В ряд лунок микротитровальной пластины вносят по 50 мкл разводящей жидкости (НКС 1 %). Исследуемую сыворотку больного в разведении 1 : 10 вносят в первую лунку в объеме 25 мкл и титруют в 7–8 лунках. Из последней лунки 50 мкл жидкости удаляют для сохранения одинакового объема. Затем в каждую лунку вносят по 25 мкл туляреминого эритроцитарного антигенного диагностикума в концентрации 0,5 % (т. е. 2,5%-й диагностикум дополнительно разводят в 5 раз). Пластину осторожно встряхивают, оставляют на 2 ч при комнатной температуре и учитывают результаты реакции. При положительном результате реакции сенсibilизированные эритроциты выпадают на дно лунки равномерным слоем в виде «зонтика». При отрицательном результате реакции эритроциты оседают на дно лунки в виде «пуговки» или кольца. Титром сыворотки считают последнее разведение, давшее четкую агглютинацию эритроцитов.

В реакции предусматривают контроли:

- контроль диагностикума: 50 мкл разводящей жидкости + 25 мкл 0,5%-го туляреминого эритроцитарного антигенного диагностикума;

- контроль исследуемой сыворотки: 50 мкл разводящей жидкости + 50 мкл исследуемой сыворотки + 25 мкл 0,5%-х несенсибилизированных эритроцитов.

Контроли должны дать четко отрицательную реакцию.

Таблица 8

Реакция непрямо́й гемагглютинации

Ингредиенты, мкл	№ лунки								Контроли	
	1	2	3	4	5	6	7	8	сыво- ротки	диагно- стикума
Разводящая жидкость	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Исследуемая сыворотка больного в разведении 1 : 10	50	50	50	50	50	50	50	50	50	–
Туляремийный эритроцитарный антигенный диагностикум 0,5 %	25	25	25	25	25	25	25	25	–	25
0,5%-е несенсибилизированные эритроциты (мкл)	–	–	–	–	–	–	–	–	25	–
Полученное разведение сыворотки	1 : 20	1 : 40	1 : 80	1 : 160	1 : 320	1 : 640	1 : 1280	1 : 2560	1 : 20	

3.4. Реакция торможения непрямо́й гемагглютинации (табл. 9)

РТНГА ставят параллельно с РНГА для подтверждения ее специфичности. В ряд лунок микротитровальной пластины вносят по 25 мкл разводящей жидкости (НКС 1 %). В первую лунку вносят 25 мкл исследуемой сыворотки в том же разведении, что и в РНГА, и титруют в 7–8 лунках. Из последней лунки 25 мкл жидкости удаляют для сохранения одинакового объема. Затем в каждую лунку добавляют по 25 мкл взвеси убитых бактерий в концентрации 5×10^8 м.к./мл (туляремийный диагностикум, содержащий $2,5 \times 10^{10}$ м.к./мл, дополнительно разводят в 50 раз). Пластину осторожно встряхивают и оставляют на 1 ч при комнатной температуре или 0,5 ч при 37 °С. После чего в каждую лунку вносят по 25 мкл 0,5% туляремийного анти-

генного диагностикума. Пластину оставляют на 2 ч при комнатной температуре и учитывают результаты реакции. В РТНГА результат реакции должен быть отрицательным (в лунках «пуговки» или кольца) или на 3–4 лунки меньше, чем в РНГА. Такой результат реакции подтверждает специфичность РНГА.

Таблица 9

Реакция торможения непрямо́й гемагглютинации (РТНГА)

Ингредиенты, мкл	№ лунки							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Разводящая жидкость	25	25	25	25	25	25	25	25
Исследуемая сыворотка 1 : 10	25	25	25	25	25	25	25	25
Туляреми́нный диагностикум 5×10^8 м.к./мл	25	25	25	25	25	25	25	25
Пластину оставляют на 1 ч при комнатной температуре								
0,5%-й туляреми́нный эритроцитарный антигенный диагностикум	25	25	25	25	25	25	25	25
Полученное разведение сыворотки	1 : 40	1 : 80	1 : 160	1 : 320	1 : 640	1 : 1280	1 : 2560	1 : 5120

4. АЛЛЕРГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ

4.1. Реакция лейкоцитолита (*in vitro*)

Эта реакция основана на учете разрушения лейкоцитов сенсibilизированного организма под влиянием специфического аллергена. Реакция лейкоцитолита становится положительной к 3–4 дню с момента заболевания или вакцинации.

В две лунки полистироловой пластины вносят по 50 мкл 5%-го раствора цитрата натрия. Кровь для исследования берут у людей из пальца в объеме 200 мкл с помощью микропипетки и вносят по 100 мкл в обе лунки, в первую (опытную) лунку вносят 100 мкл кожного тулярина, во вторую (контрольную) – 100 мкл физиологического раствора (рН 7,2). Содержимое лунок перемешивают стеклянной палочкой, пластину закрывают и помещают на 2 ч в термостат при 37 °С. Через 2 ч содержимое опытной лунки перемешивают, микропипеткой набирают 20 мкл и переносят в лунку, содержащую 400 мкл 3%-й уксусной кис-

лоты, подкрашенной метиленовой синькой до светло-голубого цвета. То же проделывают с кровью из контрольной лунки. Затем производят подсчет лейкоцитов в камере Горяева. Разрушенные клетки, а также собирающиеся в кучки лейкоциты не учитывают. Коэффициент лейкоцитоза вычисляют по формуле:

$$K\% = \frac{mk - mo}{mk} \times 100\%,$$

где: mk – количество лейкоцитов в контрольной лунке;

mo – количество лейкоцитов в опытной лунке.

Полученные результаты оценивают по шкале:

K – 15 % и ниже – отрицательный или сомнительный;

K – от 16 до 20 % – слабо положительный;

K – от 21 до 30 % – положительный;

K – выше 30 % – резко положительный.

5. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МЕТОД (ПЦР С РОДОСПЕЦИФИЧЕСКИМИ ПРАЙМЕРАМИ)

Для постановки реакции используются следующие тест-системы: «Ген – *Francisella tularensis* – РГФ», «Ген – *Francisella tularensis* – РЭФ», разработанные в Российском научно-исследовательском противочумном институте «Микроб».

Данные тест-системы предназначены для выявления возбудителя *F. tularensis* в клиническом материале и объектах внешней среды при помощи системы праймеров, комплементарных участку гена, кодирующего белок молекулярной массой 23 kD.

Принцип реакции заключается в многократно повторяющихся циклах синтеза (амплификации) специфичной области ДНК-мишени в присутствии термостабильной ДНК-полимеразы, дезоксинуклеозидтрифосфатов (дНТФ), соответствующего солевого буфера и олигонуклеотидных затравок – праймеров, определяющих границы амплифицируемого участка ДНК. Каждый цикл включает в себя три стадии с различными температурными режимами. На первой стадии при 94 °С происходит разделение цепей ДНК, затем при 53 °С – присоединение (отжиг) праймеров к гомологичным последовательностям на ДНК-мишени, на третьей стадии при температуре 72 °С – синтез новых цепей ДНК путем удлинения праймеров в направлении 5–3' конца. В каждом цикле происходит удвоение числа копий амплифицируемого участка, ограниченного парой выбранных праймеров, что позволяет за 35 ци-

клов наработать ДНК в количестве, достаточном для ее детекции с помощью электрофореза.

5.1. Исследование материала для выявления ДНК возбудителя туляремии при помощи метода ПЦР

Исследование состоит из трех последующих этапов:

- отбор и обеззараживание проб для исследования в ПЦР;
- приготовление реакционной ПЦР смеси для постановки реакции;
- детекция продуктов амплификации методом электрофореза, учет и оценка результатов.

5.1.1. Отбор и обеззараживание проб для исследования в ПЦР

Материалом для исследования могут быть пробы от больного (пунктат из бубона, соскоб из зева, отделяемое из глаза и др.), пробы из окружающей среды (вода, смывы, суспензии органов грызунов, кровь, кровососущие членистоногие и др.), бактериальные культуры. Отбор проб осуществляется с соблюдением правил асептики, стерильным инструментом в одноразовые емкости. Обеззараживание материала, подлежащего исследованию, проводят согласно МУ 1.3.2569-09 мертиолятом натрия (1:10000) с последующей обработкой лизирующим буфером с гуанидинтиоцианатом и прогреванием при 65 °С в течение 15 мин.

Пробы крови, содержимого бубона, мазков из зева и с конъюнктивы глаза, отделяемого язвы исследуют без предварительной подготовки, отбирая для анализа по 0,1 мл нативного материала в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл.

К мокроте (1–2 мл) добавляют равный объем приготовленной *ex tempore* смеси NALC (0,25 г N-ацетил-L-цистеина, 25 мл 4%-го раствора NaOH, 25 мл 0,1 М тризамещенного цитрата натрия или набор Муколизин, ИнтерЛабСервис). Перемешивают покачиванием в течение 20–30 с. Смесь инкубируют в течение 15 мин при комнатной температуре, а затем разводят 0,067 М фосфатным буфером (pH 6,8) до 50 мл. Центрифугируют в течение 15 мин при 10000 об/мин. Осадок используют для выделения ДНК.

Кусочки органов массой до 10 г растирают в стерильной ступке со стеклянным порошком, после чего добавляют 0,9%-й раствор натрия хлорида в соотношении 1 : 5 (вес/объем). Надосадочную жидкость отбирают с помощью пипетки через ватный тампон в отдельную пробирку. Центрифугируют в течение 15 мин при 12000 об./мин, осадок суспендируют в физиологическом растворе и используют

для выделения ДНК. Подготовку гидробионтов осуществляют аналогичным образом.

Блох перед исследованием усыпляют эфиром, нанося каплю эфира на ватно-марлевую пробку. Ссыпают в стерильную ступку, куда вносят 0,5 мл 0,9%-го раствора натрия хлорида и растирают. Затем с помощью пипетки через ватный тампон в отдельную микропробирку отбирают надосадочную жидкость, из которой проводят выделение ДНК.

Пробы клещей, объединенных по 5–50 шт., комаров, объединенных по 50–100 шт. (в зависимости от вида, точки сбора, упитанности и т. д.), растирают в охлажденной стерильной фарфоровой ступке с 0,5–1,0 г охлажденного стерильного стеклянного порошка, добавляют 1–2 мл охлажденного 0,9%-го раствора натрия хлорида. Затем переносят по 1,0 мл жидкой фазы в пластиковые микропробирки объемом 1,5 мл. Подготовленные образцы центрифугируют при 12000 об./мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость используют для выделения ДНК, для чего отбирают 0,1 мл образца.

Отобранные навески соломы и мякины измельчают при помощи ножниц и пинцета на листе бумаги, затем помещают в банки. К исследуемому материалу добавляют 0,9%-й раствор натрия хлорида 1 : 10, тщательно перемешивают в течение 15 мин, отстаивают в течение 10 мин для оседания крупных частиц. Надосадочную жидкость дробно центрифугируют: первоначально в течение 2–3 мин при 5000 об./мин, затем супернатант центрифугируют в течение 15 мин при 12000 об./мин. Осадок суспендируют в 0,2–0,5 мл дистиллированной воды. Подготовку гнезд грызунов осуществляют аналогичным образом.

Пробы погадок птиц и помета хищных млекопитающих суспендируют в физиологическом растворе из расчета 1:9 (1 часть пробы + 9 частей физиологического раствора). Для исследования отбирают 1 мл суспензии и переносят в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл. Пробирки центрифугируют при 5000 об./мин в течение 5 мин. Отдельным наконечником с аэрозольным барьером из каждой пробирки отбирают надосадочную жидкость и переносят в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл. Затем центрифугируют при 12000 об./мин в течение 15 мин, надосадочную жидкость удаляют. Осадок ресуспендируют в 0,1 мл 0,9%-го раствора натрия хлорида и используют для исследования.

Пробы воды открытых водоемов объемом 1,0 л дробно центрифугируют. Первоначально – в течение 15 мин при 10000–12000 об./мин. Полученный осадок ресуспендируют в 0,5 мл физиологического раствора, помещают в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл и цен-

трифугируют при 2000–5000 об./мин в течение 1 мин. Надосадочную жидкость отбирают наконечником с аэрозольным барьером в микропробирку объемом 1,5 мл. Для выделения ДНК используют 0,1 мл надосадочной фракции.

5.1.2. Приготовление реакционной ПЦР смеси для постановки реакции

Для проведения амплификации готовят необходимое количество микропробирок $V = 0,6$ мл, соответствующее числу проб, а также две микропробирки для положительного и отрицательного контролей. Реакционную смесь готовят в отдельной пробирке из расчета на одну пробу: H_2O – 7,0 мкл, 10×Буфер – 2,5 мкл, дНТФ – 2,5 мкл, $MgCl_2$ – 1 мкл, праймеров FT23s1 и FT23a1 – по 1 мкл каждого, фермента Taq-полимеразы – 0,2 мкл. Во все пробирки вносят по 15 мкл реакционной смеси и добавляют 30 мкл (1 капля) минерального масла.

В соответствующие пробирки для проведения амплификации, используя одноразовые наконечники с фильтром, вносят под масло по 10 мкл подготовленных проб. В пробирку, помеченную как положительный контроль, вносят 10 мкл контрольной ДНК; в отрицательный контроль – 10 мкл H_2O . Все подготовленные микропробирки центрифугируют 20 сек при 2000 об./мин и помещают в амплификатор. Проводят ПЦР в следующем температурном режиме: денатурация при 94 °С в течение 3 мин; затем 35 циклов: 94 °С – 40 сек, 53 °С – 40 сек, 72 °С – 40 сек, в заключение проводят дополнительный цикл при 72 °С в течение 5 мин.

5.1.3. Детекция продуктов амплификации методом электрофореза, учет и оценка результатов.

Продукты ПЦР анализируют методом гель-электрофореза в 1,5% агарозе, который готовят на ТАЕ-буфере с бромистым этидием (состав ТАЕ-буфера: трис-НСl – 4,84 г; ледяная уксусная кислота – 1,2 мл; раствор ЭДТА в концентрации 0,5 М; бромистый этидий – до конечной концентрации 0,5 мкг/мл, общий объем доводят дистиллированной водой до 1 л, рН 8,0).

К 10–20 мкл ПЦР продукта добавляют 1–2 мкл 10-кратного буферного раствора, содержащего: бромфеноловый синий – 0,25 %, фиколл – 25 % в дистиллированной воде. Подготовленные смеси вносят в лунки агарозного геля.

Окрашенный бромистым этидием гель просматривают под ультрафиолетовым излучением, для чего используют трансиллюминатор с максимальной длиной волны 254 нм. Анализируемые фрагменты проявляются в виде светящихся розово-красных полос.

При оценке результатов в отрицательном контроле полосы должны отсутствовать, в положительном контроле выявляется полоса фрагмента размером 548 н.п., в анализируемых пробах отсутствие полосы строго на уровне положительного контроля свидетельствует об отрицательном ответе, а наличие полосы, соответствующей по электрофоретической подвижности положительному контролю, свидетельствует о наличии в пробе ДНК *F. tularensis*.

ПАСПОРТ ШТАММА

Вид микроба _____

Штамм № _____

Дата сбора материала _____

Дата выделения культуры _____

Место выделения _____

Объект выделения _____

Метод выделения _____

Вид животного, взятого в биопробу _____

Способ заражения _____

Срок гибели биопробного животного _____

Кем выделена культура _____

Характеристика штамма _____

Характер роста на среде Мак-Коя _____

Морфология и окраска микроба в мазках _____

Рост на МПА _____

Ферментация глицерина _____

Тест на цитруллинуреидазу _____

Чувствительность к эритромицину _____

Агглютинабельность специфической сывороткой _____

Патогенность для биопробных животных _____

Вирулентность _____

ПЦР с родоспецифическими праймерами _____

Врач, изучивший культуру _____

Заведующий лабораторией _____

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ

1. Номенклатурное положение возбудителя туляремии.
2. Источники туляремийной инфекции.
3. Факторы и пути передачи туляремийной инфекции.
4. Влияние физических и химических агентов на жизнеспособность туляремийного микроба.
5. Материал, подлежащий исследованию на туляремию.
6. Морфологические и тинкториальные свойства туляремийного микроба.
7. Антигенная структура возбудителя туляремии.
8. Культуральные свойства туляремийного микроба.
9. Питательные среды, используемые для культивирования возбудителя туляремии.
10. Ферментативная активность туляремийного микроба.
11. Вирулентность и патогенность туляремийного микроба для диких позвоночных животных и человека.
12. Изменчивость туляремийного микроба при выращивании на искусственных питательных средах, в организме животных, в природных условиях.
13. Устойчивость туляремийных бактерий к воздействию факторов окружающей среды.
14. Лабораторный диагноз туляремии у человека.
15. Особенности лабораторной диагностики туляремии при эпизоотологическом обследовании территории.
16. Экспрессные и ускоренные методы диагностики туляремии.

НОРМАТИВНЫЕ ДОКУМЕНТЫ И РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». – 2021. – 1092 с.
2. СанПиН СП 3.1.7.2642-10 «Профилактика туляремии». – 2010. – 18 с.
3. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство // Под ред. Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырева. – М., 2009. – 472 с.
4. Методические указания МУ 3.1.2007-05. 3.1. Профилактика инфекционных болезней. Эпидемиологический надзор за туляремией. – М., 2005. – 34 с.
5. Методические указания МУК 4.2.2939-11 Порядок организации и проведения лабораторной диагностики туляремии для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней: Методические указания. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. – 2012. – 59 с.
6. Методические указания МУ 1.3.2569-09. Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности. – М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – 2009. – 42 с.
7. Методические рекомендации МР 4.2.0089 – 14. Использование метода времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS) для индикации и идентификации возбудителей I–II групп патогенности. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2015. – 19 с.
8. Олсуфьев Н.Г. Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии. – М., 1975. – 194 с.

**РУКОВОДСТВО
К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ
ПО ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ТУЛЯРЕМИИ**

**Учебное пособие
для врачей-бактериологов**

Корректор *Булкина С.В.*
Оригинал-макет *Арсентьев Л.И.*
Художник *Фалеев К.А.*

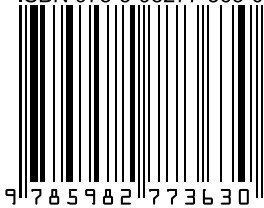
Сдано в набор 02.06.2022. Подписано в печать 17.06.2022. Бумага офсетная.
Формат 60x84^{1/16}. Гарнитура Cambria.
Усл. печ. л. 3,26. Тираж 130 экз. Заказ № 029-22.

ИНЦХТ
Иркутск, ул. Борцов Революции, 1. Тел. (395-2) 29-03-37.
E-mail: arleon58@gmail.com

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ ДЛЯ ВРАЧЕЙ-БАКТЕРИОЛОГОВ



ISBN 978-5-98277-363-0



9 785982 773630