

Зоологический

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР

197
31/VII 1974



МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
ПО ПОИСКУ И ИЗУЧЕНИЮ ЭПИЗООТИЙ ТУЛЯРЕМИИ
ПУТЕМ ОБНАРУЖЕНИЯ (АНТИГЕНА ВОЗБУДИТЕЛЯ
В ПОГАДКАХ ПТИЦ И ПОМЕТЕ ХИЩНЫХ
МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Москва—1974 год

5

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра
здравоохранения СССР
П. Н. Бургасов
№ 1125—73
10 октября 1973 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

по поиску и изучению эпизоотий туляремии путем обнаружения
антигена возбудителя в погадках птиц и помете
хищных млекопитающих*

Установление энзоотичности территории по туляремии, а также своевременное выявление этой инфекции среди диких млекопитающих, необходимо для правильного планирования и проведения профилактических мероприятий. В поисках эпизоотий туляремии обычно прибегают к бактериологическому исследованию собранных в природе трупов, отловленных различными способами диких животных, субстрата, загрязненного их выделениями, и членистоногих переносчиков. При локальных эпизоотиях бактериологические методы бывают не всегда эффективны даже при исследовании большого количества материала. Учитывая большие трудозатраты на сбор полевого материала и его обработку, целесообразно детальное бактериологическое обследование местности проводить лишь после ориентировочного определения в той или иной ее части эпизоотии туляремии.

Для такого рекогносцировочного обследования значительных территорий следует широко применять серологическое исследование погадок птиц, помета хищных млекопитающих и мумифицированных трупов на содержание антигена тулярийного микроба.

Преимущества данного метода заключаются в малой трудоемкости процессов 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 может быть применен для раннего и ретроспективного выявления эпизоотии, определения ее границ и установления видов животных, вовлеченных в процесс циркуляции возбудителя.

* Составители: Б. П. Доброхотов и И. С. Мещерякова, Лаборатория туляремии отдела природноочаговых инфекций ИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР.

Поедая в природе преимущественно ослабленных больших зверьков или их трупы, хищники осуществляют выбор из популяции именно того материала, который желателен для лабораторного исследования.

Погадка представляет собою плотный продолговатый комок неперевариваемых частей пищи (шерсть, кости, перья, хитин насекомых и т. п.), формирующийся в зобу птицы и выбрасываемый ею через рот по окончании процесса пищеварения. Образование погадок отмечается у всех хищных птиц (орлы, канюки, ястребы, соколы, луны, совы) чаек и врановых; реже у других видов, если в их питании содержится большое количество балластных веществ. Костные остатки млекопитающих в погадках хорошо сохраняются, что позволяет установить видовую принадлежность съеденных животных. Птицы сбрасывают погадки во время отдыха через 10—20 часов после кормежки. Каждая погадка содержит остатки одного зверька у мелких птиц и нескольких у крупных хищников. Наблюдениями установлено, что летом при гнездовании птицы придерживаются определенных участков (гнездовая территория), а осенью и зимой в период кочевок не улетают для отдыха далеко от мест охоты. Можно считать, что исследование содержимого погадок характеризует именно ту территорию, на которой погадки собраны (в пределах 2—3 км от точек сбора).

Помет хищных млекопитающих (семейства куньих, собачьих и кошек) также состоит из непереваренных частей пищи (шерсть, кости, хитин). Видовой состав пищи по этим остаткам определить труднее, так как они были разжеваны и прошли пищеварительный тракт зверя. Участок охоты хищных млекопитающих, как правило, постоянен и занимает территорию в несколько квадратных километров.

Длительность сохранения погадок и помета в природе зависит прежде всего от климатических условий местности. В зонах достаточного увлажнения разрушение их происходит в течение 4—5 месяцев под воздействием гнилостных процессов и насекомых некрофагов. В засушливом климате степей и пустынь они могут сохраняться более длительное время, особенно если попадают в укрытия (пещеры, щели и т. п.). Гибель туляремийного микроба в погадках и помете происходит быстро (в первые сутки после выделения: при отрицательных температурах возможно и дольше), в связи с чем бактериологическое исследование этого материала нецелесообразно. Антиген микроба, представляющий собою сложный липополисахарид, устойчив и обычно обнаруживается в течение всего времени сохранения погадок и помета. Он не разрушается под воздействием внешних факторов среды, но может быть вымыт атмосферными осадками.

Для поисков антигена туляремийного микроба в суспензиях погадок и помета применяют реакцию нейтрализации антител (РНАт) с туляремийным антигенным эритроцитарным диагностикумом. Использование для этих целей реакции пассивной гемагглютинации с туляремийным **антительным** эритроцитарным диагностикумом не рекомендуется из-за большого количества неспецифических и нечетких результатов.

Выполнение работ по обнаружению и изучению эпизоотий туляремии описываемым методом состоит из следующих этапов: 1) сбор материала в полевых условиях; 2) подготовка материала к исследованию; 3) постановка реакции нейтрализации антител (РНАт); 4) анализ полученных данных.

Сбор материала в полевых условиях

В бесснежное время года в открытых ландшафтах в течение одного дня можно собрать материал, содержащий остатки большого числа мелких млекопитающих, с территории нескольких сотен квадратных километров, если использовать для передвижения автомашину. Труднее, но все же возможно, проводить сбор зимой. Погадки следует искать поблизости от тех мест, где птицы гнездятся, ночуют или отдыхают. Обычно это возвышенные предметы, на которые птицы любят присаживаться: у высоких построек, вышек, отдельных деревьев, ометов соломы, стогов сена, земляных холмиков среди полей, столбов линий связи и электропередач и т. д. Сборы у столбов бывают особенно удачны в малолюдных местах вдоль проселочных дорог, но не около магистралей с оживленным движением. В случае необходимости в интересующих местах можно создавать искусственные присады для птиц (шесты высотой 2—3 м с перекладиной, груды камней и т. п.). Помет хищных млекопитающих также можно обнаружить чаще всего около выдающихся на местности предметов, на тропах и у лугович.

В луго-полевых и степных очагах туляремии собирать материал следует поздней осенью, до установления снегового покрова и ранней весной, сразу после снеготаяния. Это позволит получить характеристику эпизоотийного состояния популяции мелких млекопитающих на протяжении всего года, установить начало и длительность эпизоотии. В пойменно-болотно-озерных очагах наиболее удобное время сбора — вторая половина лета, когда возникают эпизоотии среди околводных видов млекопитающих. В это время проходит покос трав, и поставленные стога сена являются хорошим местом для отдыха птиц. В лесных ландшафтах собирать погадки птиц удается только около их гнезд или по кромке леса и опушкам. Непосредственно в лесных массивах особое внимание следует уделять сбору экскрементов хищных млекопитающих.

носа. осень
ранняя
весна

2 аб
пол-лета

Каждую найденную погадку или пробу помета заворачивают в отдельный лист бумаги. Собранный материал с одного места помещают в матерчатые мешки и этикетировывают. Такая упаковка позволяет в дальнейшем исследовать каждый образец индивидуально. Быстрое отмирание туляремийного микроба в кислой среде погадок позволяет проводить их сбор в природе и дальнейшую обработку без специального режима, соблюдая лишь обычные гигиенические правила. При необходимости собранный материал можно хранить длительное время, если его просушить с целью предупреждения загнивания.

Подготовка материала к исследованию

Каждую погадку или пробу помета рекомендуется исследовать индивидуально. После поступления в лабораторию материал просушивают при комнатной температуре и взвешивают с точностью до 0,1 г на рычажных или пружинных весах. Это позволит в дальнейшем придерживаться сравнимого исходного разведения суспензии (по сухому весу). Например, если к образцу весом 1 г добавить 4 мл физиологического раствора, то получим разведение 1 : 5, а при добавлении 9 мл — 1 : 10 и т. д. После взвешивания дальнейшую обработку можно проводить двумя способами:

1. Взвешенный образец помещают в специальный пакет, сваренный из тонкой полиэтиленовой пленки тепловым прибором «Молния» или другим способом; размер пакета определяется величиной исследуемого материала. Нижний край пакета сужается на конус, верхний оставляют открытым, а после помещения внутрь исследуемого образца, перегибают, сшивают скрепочной канцелярской машинкой или сшивают. Затем шприцем непрерывного действия через прокол верхнего края пакета вводят подогретый (до 70°) физиологический раствор в необходимом количестве. (При использовании холодного физиологического раствора титр реакции нейтрализации антител в положительном случае будет ниже на 1—2 разведения). Содержимое разминают в однородную массу и через 20—30 минут, отрезав заостренный нижний край и закатывая пакет сверху, жидкость выдавливают в центрифужную пробирку. Эту суспензию прогревают на кипящей водяной бане 5—10 минут и после охлаждения абсорбируют взвесью 50% формализированных эритроцитов (2 капли эритроцитов на 1 мл суспензии). Через 20—30 минут суспензию центрифугируют — 10—15 минут при 2000 об/мин. Полученную прозрачную надосадочную жидкость используют для постановки реакции. Процедура истощения формализированными эритро-

цитами при данном способе является обязательной, чтобы избежать неспецифических реакций в начальных разведениях суспензии.

2. При отсутствии полиэтиленовой пленки или центрифуги можно приготовить суспензию к исследованию другим способом, который, однако, более трудоемок, требует больших затрат времени и лабораторной посуды. Погадку или помет растирают пестиком в фарфоровой ступке с необходимым количеством подогретого до 70° физиологического раствора. Полученную взвесь отсасывают через кусочек ваты пастеровской пипеткой, переносят в бактериологическую пробирку и подвергают 5—10 минутному прогреванию на кипящей водяной бане. Затем суспензию фильтруют через стеклянную воронку с асбестовой ватой до получения относительно прозрачной жидкости, которую и используют для постановки реакции. Полученный фильтрат, как правило, не дает неспецифических реакций даже в начальных разведениях, поэтому дополнительное истощение взвеси формализированными эритроцитами не требуется.

Постановка реакции нейтрализации антител (РНАт)

Полученные экстракты материала разводят в объеме 0,25 мл (с коэффициентом 2 на 1% растворе нормальной кроличьей сыворотки в лунках полистироловых пластин. Первоначальное ориентировочное исследование проводят только в трех разведениях испытуемого материала. К каждому разведению добавляют равный объем (0,25 мл) стандартной туляремийной агглютинирующей сыворотки, содержащий две минимальные гемагглютинирующие единицы.

Определение минимальной гемагглютинирующей единицы выполняют перед постановкой РНАт, для чего туляремийную сыворотку, предварительно прогретую 30 минут при 56°, титруют в объеме 0,5 мл в разведениях от 1 : 10000 до 1 : 160000. В каждое разведение добавляют 1 каплю (0,05 мл) 2,5% взвеси антигенного туляремийного эритроцитарного диагностикума. Через 2—3 часа производят учет реакции. Последнее разведение сыворотки, вызвавшее полную агглютинацию эритроцитов, принимают за гемагглютинационный титр (минимальную сывороточную единицу). В реакции нейтрализации антител используют две сывороточные единицы. Например, если гемагглютинационный титр сыворотки равен 1 : 80000 (в объеме 0,5 мл), то две сывороточные единицы — 1 : 40000, а поскольку в РНАт во все лунки добавляется сыворотка в объеме 0,25 мл, то применительно к приведенному примеру для постановки реакции следует брать данную сыворотку в разведении 1 : 20000.

Смесь исследуемого материала и туляремийной сыворотки оставляют стоять при комнатной температуре на 1,5—2 часа, после чего во все лунки добавляют по 1 капле 2,5% взвеси эритроцитов, sensibilizированных туляремийным антигеном. Через 2—3 часа можно учитывать результат. Если в исследуемом материале содержится антиген туляремийного микроба, то он нейтрализует добавленную сыворотку, и эритроциты не агглютинируются, а образуют на дне лунки маленькое колечко с ровными краями «пуговку»), РНАт считается положительной. При отсутствии в исследуемом материале специфического антигена эритроциты агглютинируются туляремийной сывороткой и равномерно устилают дно лунки. РНАт считается отрицательной.

Пробы, в которых в предварительном опыте был обнаружен антиген туляремийного микроба, отбирают и реакцию с ними повторяют в развернутом опыте (на 6—10 лунок) для определения точного титра реакции. За титр РНАт принимают последнее разведение суспензии, вызывающее полное подавление агглютинации эритроцитов. Окончательный опыт должен сопровождаться следующими контролями: 1) для проверки отсутствия в исследуемом материале веществ, вызывающих неспецифическую агглютинацию эритроцитов — исследуемая взвесь + физиологический раствор, содержащий 1% нормальной кроличьей сыворотки + sensibilizированные эритроциты (агглютинация должна отсутствовать); 2) для определения точного количества использованных сывороточных единиц — разведения туляремийной сыворотки + sensibilizированные эритроциты; 3) для проверки качества растворителя — физиологический раствор с 1% нормальной кроличьей сыворотки + sensibilizированные эритроциты (агглютинация должна отсутствовать).

При небольшом количестве исследуемого материала целесообразно ставить РНАт, используя микротитратор. Чувствительность реакции при этом существенно не меняется. Использование микрометода позволяет значительно экономить расход эритроцитарного диагностикума, так как при этом применяют 0,5% взвесь sensibilizированных эритроцитов.

Анализ полученных данных

Присутствие антигена туляремийного микроба в исследованном материале служит достоверным критерием наличия эпизоотий туляремии на обследуемой территории в настоящее время или в недавнем прошлом и является основанием для развертывания более детальных работ для выделения возбудителя. Нанеся на карту точки положительных находок, при достаточном их количестве, можно оконтурить размеры террито-

рии, охваченной эпизоотией. Число положительных погадок и помета позволяет судить об интенсивности эпизоотии: в местах разлитых эпизоотий они составляют 20—60% от всего исследованного материала, а при локальных (вялых) эпизоотиях — 0,5—3%. Последние цифры характерны для так называемых «межэпизоотических» лет, когда туляремия среди зверьков встречается в виде спорадических случаев. При низкой численности мелких млекопитающих установить такие «цепочки» передачи возбудителя другими методами обследования в большинстве случаев не удастся. При обычно применяемых сейчас зоологами способах отлова ловушками добывается чаще всего наиболее здоровая и подвижная часть популяции.

Чтобы узнать время протекания эпизоотии, надо определить «возраст» собранных погадок и помета, что в практических условиях не всегда возможно. При этом можно ориентироваться на следующие признаки: свежесделанные погадки покрыты в течение 1—3 дней блестящей слизистой пленкой; все остальные находятся на той или иной стадии разрушения, определяемой климатическими условиями обследуемой местности. Очень старые погадки обычно теряют округлую форму, покрыты плесенью или зелеными водорослями. Желательно длительность сохранения погадок в природе проверять опытным путем для каждой конкретной местности. Сбор погадок и помета под одними и теми же объектами несколько раз в год позволяет более точно определить время их выделения. Ориентиром времени может служить также дата постановки стогов сена или ометов соломы, у которых проводят сбор.

Видовой состав грызунов, вовлеченных в эпизоотический процесс, удастся определить до вида или рода по хорошо сохраняющимся костным остаткам (особенно по зубам). Содержимое полиэтиленовых пакетов, давших положительный результат в РНАт, просматривают и сравнивают с эталонной коллекцией костей скелета и зубов животных, характерных для данной местности. Если обработку материала проводят в ступках, определение его следует проводить еще до растирания и заливки физиологическим раствором. Выявленным видам уделяется особое внимание, если в данной точке проводят дальнейшие зоологические работы. Каждая погадка (или помет) обычно содержит остатки 1—2 мелких зверьков и лишь в годы массовых размножений грызунов — до 5 зверьков. Если хоть один из них был заражен туляремией, то этого достаточно для обнаружения антигена микроба в РНАт.

Л 73008 от 4/І-1974 г.

Зак. 406

Тир. 1000

Типография Министерства здравоохранения СССР