

ГЛАВА 3.1.22.

ТУЛЯРЕМИЯ

РЕЗЮМЕ

Описание заболевания: Туляремия – зоонозная инфекция, вызываемая *Francisella tularensis*. Вызывающая болезнь бактерия - грамотрицательная кокковидная палочка, 0,2-0,5 мкм × 0,7-1,0 мкм, неподвижная, спор не образует, является облигатным аэробом, оптимальный рост при 37°C. Она является оксидаза-отрицательной, слабо каталаза-положительной, и для ее роста необходим цистеин. Главным образом она встречается у зайцеобразных и у грызунов, но также сообщалось об инфицировании многих видов других млекопитающих и нескольких видов птиц. Членистоногие, питающиеся кровью, играют важную роль в сохранении *F. tularensis* в природе и в передаче заболевания.

Болезнь характеризуется лихорадкой, угнетенным состоянием и часто септицемией. У людей могут наблюдаться язвы или гнойники в месте заражения (это редко наблюдается у животных), увеличение региональных лимфоузлов. При патологоанатомическом исследовании поражения могут включать казеозный некроз лимфоузлов и многочисленные очаги некроза серо-белого цвета в селезенке, печени, легких, околосердечной сумке, почках и других органах. Селезенка обычно увеличена в септицемических случаях.

Важно понимать, что существует высокий риск контактного заражения человека при непосредственном контакте с данным организмом. Таким образом, при работе с инфекционным материалом рекомендуется принимать особые меры предосторожности: надевать перчатки, маски и защитные очки. Все лабораторные манипуляции с живыми культурами или потенциально зараженным или контаминированным материалом должны проводиться в соответствии с надлежащим уровнем биобезопасности и биозащиты, который определен в анализе биорисков (см. Глава 1.1.4 Биобезопасность и биозащита: Стандарт управления биологическим риском в ветеринарных лабораториях и вивариях).

Идентификация агента: Полимеразная цепная реакция является безопасным и удобным способом выявления и идентификации *F. tularensis* в клинических образцах. Бактерии могут обнаруживаться в мазках-отпечатках или в зафиксированных образцах органов при помощи реакции флуоресценцирующих антител или иммуногистохимии. При окрашивании по методу Грама бактерии проявляются как очень мелкие точечные грамотрицательные палочки, которые зачастую трудно распознать как бактерии.

Организм крайне прихотлив. Для выращивания необходимо использовать среду Френсиса, среду Мак-Коя и среду Чепина, или модифицированный агар Тайера-Мартина. В некоторых случаях для успешного выделения требуется селективная среда или заражение мышей. Колонии небольшие, круглые и прозрачные, и не появляются ранее 48 часов инкубирования при 37°C. Если необходима транспортировка, образцы должны вводиться в стерильный питательный бульон и храниться при 4-10°C в течение нескольких часов или на сухом льду в случае длительной транспортировки.

Серологические тесты: Серологические тесты являются эффективными диагностическими средствами при инфекции у человека, но они имеют ограниченную пригодность для более восприимчивых видов животных, которые обычно умирают, прежде чем выработаются антитела. Эпидемиологические исследования можно проводить у домашних животных, относительно резистентных видов, которые выживают после заражения, таких как овцы, крупный рогатый скот, свиньи, собаки, кошки, дикие копытные животные, лисы и дикие кабаны, так как у этих видов вырабатываются антитела. Также в эпидемиологических исследованиях можно использовать относительно резистентные виды грызунов и зайцеобразных (например, заяц-русак в центральной Европе).

Требования к вакцинам: Живой аттенюированный штамм вакцины *F. holarctica* (LVS, NCTC 10857) десятилетиями использовался в качестве вакцины против туляремии, особенно для лаборантов, работающих с большим объемом культуры *F. tularensis*. Данная вакцина более не используется в связи с ее общей ограниченной эффективностью и вероятностью возврата к вирулентности, хотя производный вакцинного штамма LVS до сих пор используется для иммунизации людей в эндемичных районах России. Новые вакцины против туляремии находятся в стадии разработки, но еще не лицензированы для использования для людей или животных.

А. ВВЕДЕНИЕ

Туляремия - зоонозная инфекция, вызываемая *Francisella tularensis*. В природе она встречается у зайцеобразных (кролики и зайцы), и у грызунов, особенно у семейства полевковых (полевки, водяные крысы и ондатры) и у бобров. Также сообщалось об инфицировании многих видов других млекопитающих, птиц, земноводных и беспозвоночных (Gyuranecz, 2012; Morner & Addison, 2001). Туляремия имеет эндемическое распространение в Северном полушарии. Эпизоотические вспышки болезни могут происходить во многих странах в Северной Америке и Европе, в то время как в некоторых других странах Европы и Азии происходят только спорадические случаи болезни. Данная болезнь редко регистрируется в тропиках или в Южном полушарии.

Признаны два наиболее значимых с клинической точки зрения типа *Francisella tularensis* на основе характеристик культур, эпидемиологии и вирулентности. *Tularensis* (Тип А), подвид *Francisella tularensis*, ассоциируется главным образом с зайцеобразными в Северной Америке. Он передается главным образом клещами или жалящими мухами, или при прямом контакте с зараженными зайцеобразными. Он является высоковирулентным для человека и домашних кроликов, большинство изолятов ферментируют глицерин. *Holarctica* (Тип В), подвид *Francisella tularensis*, главным образом встречается у водных грызунов (бобры, ондатры) и у полевок в Северной Америке, и у зайцеобразных (зайцев) и грызунов в Евразии. Он передается главным образом при прямом контакте или посредством членистоногих (главным образом клещей и комаров), но может передаваться аспирационным путем или через зараженную воду или продукты. Он является менее вирулентным для человека и домашних кроликов, и не ферментирует глицерин (Ellis *et al.*, 2002; Keim *et al.*, 2007; Morner & Addison, 2001).

У чувствительных животных наблюдаются признаки тяжелого угнетения с последующей смертельной септициемией. Течение болезни составляет приблизительно 2-10 дней у чувствительных видов, и животные обычно мертвы, когда их передают на диагностику. У

большинства домашних видов обычно не проявляются признаки туляремии, но у них вырабатываются специфичные антитела к данному организму после заражения. Вспышки с высокой смертностью, вызванные организмом Типа А, происходили среди овец (Morner & Addison, 2001). Среди домашних животных сообщалось, что кошки могут выступать в качестве переносчика бактерии и болезнь порой передается от кошек человеку.

Аутопсия показала, что животные, которые умерли от острой туляремии, обычно находятся в хорошем физическом состоянии. Имеются признаки септицемии, которые характеризуются белыми очагами некроза, неравномерно распределенными в печени, костном мозгу и селезенке. В дополнение к этому, селезенка обычно увеличена. Очаги некроза различаются в размере, и в некоторых случаях они едва различимы невооруженным глазом. Обычно наблюдается застой и отек в легких, также могут присутствовать уплотнения в легких и фибринозная пневмония или плеврит. Фибрин может присутствовать в брюшной полости. Очаги казеозного некроза часто присутствуют в одном или нескольких лимфатических узлах. Поражаются чаще всего лимфатические узлы, которые находятся в брюшной и плевральной полости, а также лимфатические узлы, дренирующие конечности. У менее чувствительных видов макроскопическая картина может напоминать туберкулез с гранулемами в подострой или хронической форме в легких, околосердечной сумке, почках, селезенке и печени. Макрофаги являются главными клетками, образующими гранулемы, но также иногда обнаруживают другие клетки, включая лимфоциты, гетерофильные гранулоциты, многоядерные гигантские клетки и фиброциты. Точечный или мультифокальный некроз часто наблюдается в центре этих поражений (Gyuranecz, 2012; Gyuranecz *et al.*, 2010).

Существует высокий риск заражения человека *F. tularensis*, так как инфицирующая доза чрезвычайно мала и зараженные животные выделяют бактерии с мочой и фекалиями. Заражение может произойти при простом контакте. Следует принимать надлежащие меры безопасности, такие как ношение перчаток, масок и защитных очков во время работы с патологическими образцами или культурами во избежание заражения людей. Все лабораторные манипуляции с живыми культурами или потенциально зараженным или контаминированным материалом должны проводиться в соответствии с надлежащим уровнем биобезопасности и биозащиты, который определен в анализе биорисков (см. Глава 1.1.4 *Биобезопасность и биозащита: Стандарт управления биологическим риском в ветеринарных лабораториях и вивариях*). Страны, у которых нет доступа к специализированной национальной или региональной лаборатории, должны отправлять образцы в Справочную лабораторию МЭБ. Экспериментально зараженные животные и их испражнения представляют особую опасность для человека.

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Таблица 1. Тесты, доступные для диагностики туляремии и их цели

Метод	Цель					
	Свобода популяции от инфекции	Свобода отдельных животных от инфекции перед перемещением	Содействие политике искоренения	Подтверждение клинических случаев	Распространение инфекции – надзор	Иммунный статус у отдельных животных или популяций после вакцинации
Идентификация агента¹						
Выделение бактерии	-	-	-	+++	-	Не применимо
Выявление антигена	-	-	-	+++	-	Не применимо
ПЦР в реальном времени	+++	-	-	+++	+++	Не применимо
Выявление иммунной реакции						
SAT	+++	+++	+++	++	+++	Не применимо
TAT	++	+++	++	+++	+++	Не применимо
MAT	++	+++	++	+++	+++	Не применимо
ELISA	++	+++	++	++	+++	Не применимо

+++ = рекомендуемый метод; ++ = подходящий метод; + = может применяться в некоторых ситуациях, но стоимость, надежность или другие факторы строго ограничивают его применение; - = не подходит для этой цели.

Хотя не все тесты, относящиеся к категории +++ или ++, прошли формальную валидацию, их рутинный характер и факт того, что они широко применялись без сомнительных результатов, делает их подходящими. ПЦР = полимеразная цепная реакция; SAT = реакция агглютинации на стекле; TAT = реакция агглютинации в пробирке; MAT = реакция микроагглютинации; ELISA = твердофазный иммуноферментный анализ;

1. Идентификация агента

Francisella tularensis может быть продемонстрирована в мазках или в гистологических срезах. Так как патологоанатомическая картина меняется, иногда трудно поставить диагноз, и предпочтительными являются иммунологические и иммуногистохимические методы, хотя могут быть трудности в приобретении реагентов. Иногда можно рекомендовать, чтобы фиксированные образцы анализировали в лабораториях, имеющих надлежащие реагенты или методы. Ее также можно идентифицировать при помощи культуры. Однако могут быть трудности в выделении *F. tularensis* из погибших животных и туш в связи с чрезмерным ростом других бактерий. В таких случаях можно использовать селективную культуральную среду или заражение животных. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) является безопасным и удобным способом выявления и идентификации *F. tularensis* в клинических образцах.

¹ Рекомендуется комбинация методов идентификации агентов в отношении одного и того же клинического образца.

1.1. Препараты-мазки

Препараты-мазки готовятся на предметных стеклах микроскопа как мазки-отпечатки органов, таких как печень, селезенка, костный мозг, почки, легкие или кровь. В таких мазках имеется избыток бактерий, но их можно не увидеть из-за очень маленького размера (0,2-0,7 мкм). Бактерии можно продемонстрировать при помощи прямого или непрямого окрашивания флюоресцирующими антителами. Данное средство диагностики является безопасным, быстрым и специфичным (Karlsson *et al.*, 1970; Morner, 1981).

Окрашивание мазков по методу Грама показывает рассеяние мелких точкообразных грамотрицательных бактерий в пределах видимости. Использование масляной микроскопии повышает видимость бактерий. Может быть трудно отличить бактерии от осадка красителя.

1.2. Гистологические срезы

Бактерии могут быть обнаружены в срезах при помощи иммуногистохимических методов, таких как реакция иммунофлюоресценции (РИФ) (Morner, 1981) или иммуногистохимиз (Guiganecz *et al.*, 2010). Реакция обычно проводится на образцах органов, которые фиксируют на нейтральном буферном формалине и заливают в парафин. Предметные стекла обрабатывают кроличьей или мышинной антитуляремийной сывороткой, промывают и затем обрабатывают антикроличьей или антимышиной сывороткой, конъюгированной с флуоресцинизиотиоцианатом или меченой пероксидазой хрена. Образцы исследуют при помощи флуоресцентного или оптического микроскопа. Большое количество бактерий можно увидеть в некротических поражениях и в крови.

1.3. Культивирование

Francisella tularensis не растет на обыкновенных питательных средах, хотя случайные штаммы могут вырасти при изначальной изоляции, на кровяном агаре. Инкубирование проводится при 37°C в окружающем воздухе или в 5% CO₂. Для культивирования должны использоваться кровь из сердца, печень, селезенка, костный мозг или туляремийные гранулемы (из легких, околосердечной сумки, почек, печени, селезенки и т.д.) от умирающих животных. Важно использовать специальные питательные среды, такие как:

1.3.1. Среда Френсиса

Пептонный агар, содержащий 0,1% цистина (или цистеина) и 1% глюкозы, к которому добавляют до загустения, 8-10% дефибринированной кроличьей, лошадиной или человеческой крови.

1.3.2. Среда Мак-Коя и среда Чепина

Состоит из 60 г желтка куриных яиц и 40 мл физиологического раствора; среду аккуратно смешивают и коагулируют при нагревании до 75 °C.

1.3.3. Модифицированный агар Тайера-Мартина

Основа глюкозо-цистеинного агара, дополненная гемоглобином и IsoVitaleX.

Среда может храниться до 8-10 дней при 4°C. Колонии, которые образуются на среде Мак-Коя и Чепина, являются мелкими, выпуклыми, круглыми и прозрачными. Более

интенсивный рост бактерий происходит на среде Френсиса и модифицированном агаре Тайера-Мартина, при котором образуются сливающиеся колонии беловатого цвета и слизистой консистенции. На любой среде колонии не появляются ранее, чем через 48 часов инкубирования при 37°C.

Следующая селективная питательная среда может использоваться в дополнение к неселективной питательной среде: цистеиновый кровяной агар с 7,5 мг колистина, 2,5 мг амфотерицина, 0,5 мг линкомицина, 4 мг триметоприма и 10 мг ампициллина на литр (ВОЗ, 2007).

Дифференциальные критерии для идентификации *F. tularensis* включают отсутствие роста на обыкновенных питательных средах, характерную клеточную морфологию и специфичные реакции с флюоресцирующими антителами и реакции агглютинации на предметном стекле. Бактерии неподвижны, не образуют споры, имеют биполярную окраску и имеют однородный вид в 24-часовых культурах, но являются плеоморфными в более старых культурах.

Francisella tularensis можно определить в окрашенных мазках путем агглютинации с гипериммунной антисывороткой против туляремии или при помощи заражения животных. В районах Северной Америки, где могут встречаться оба типа *F. tularensis*, Тип А можно отличить от Типа В основываясь на том факте, что большинство изолятов Типа А ферментируют глицерин.

Бактерии также можно идентифицировать при помощи ПЦР.

1.4. Заражение животных

Заражение животных не рекомендуется из соображений благополучия животных. Его следует проводить только когда выделение на лабораторных животных считается неизбежным, и только там, где имеются надлежащие помещения и клетки с биозащитой (см. Глава 1.1.4).

Туляремийную гранулему или кусочек септицемического органа (например, селезенка, печень) отрезают и приблизительно 1 г образца ткани гомогенизируют и суспендируют в 2 мл физиологического раствора. Лабораторных животных (предпочтительно мышей) заражают подкожно с использованием 0,5 мл суспензии. Заболевшие животные погибнут через 2-10 дней после заражения. Образцы крови из сердца и образцы костного мозга вносят в культуральную среду в день гибели лабораторного животного (Gyuranecz *et al.*, 2009).

1.5. Молекулярные методы

Методы на основе ПЦР подходят для выявления ДНК *F. tularensis* непосредственно из образцов от людей, животных и окружающей среды. Они также могут определить подвиды или генотипы *F. tularensis*, либо в выделенных штаммах, либо непосредственно в клинических образцах.

Методы для выявления ДНК *F. tularensis*, которые использовались, включают классическую ПЦР (Barns *et al.*, 2005; Sjöstedt *et al.*, 1997) и ПЦР в реальном времени (Versage *et al.*, 2003). Следует отметить, что при ПЦР-тестировании клещей следует

использовать специфические генные мишени или секвенирование ПЦР-фрагментов для того чтобы отличить *F. tularensis* от *Francisella*-подобных эндосимбионтов (Kreizinger *et al.*, 2013; Kugeler *et al.*, 2005; Michelet *et al.*, 2013).

Традиционная ПЦР-система, нацеленная на 16S ген рРНК с последующим секвенированием ПЦР-продукта, была разработана Barns с соавторами (2005) для выявления *F. tularensis* и *F. philomiragia* а также *Francisella*-подобных эндосимбионтов клещей со следующей парой праймеров: Fr153F0.1: 5'-GCC-CAT-TTG-AGG-GGG-ATACC-3' и Fr1281R0.1: 5'-GGA-СТА-AGA-GTA-CCT-TTT-TGA-GT-3'. Условия циклирования включают первичную денатурацию в течение 10 минут при 95°C, за которой следует 30 амплификационных циклов денатурации по 30 секунд при 94°C, отжиг праймера при 60°C в течение 1 минуты и удлинение при 72°C в течение 1 минуты.

Система ПЦР в реальном времени, нацеленная на ген *tul4* была разработана Versage с соавторами (2003) для специфического выявления только *F. tularensis* со следующими праймерами и зондом: Tul4F: 5'-ATT-ACA-ATG-GCA-GGCTCC-AGA-3', Tul4R: 5'-TGC-CCA-AGT-TTT-ATC-GTT-СТТ-СТ-3' и Tul4P: FAM-5'-TTC-TAA-GTGCCA-TGA-TAC-AAG-СТТ-ССС-ААТ-ТАС-ТАА-G-3'-BHQ. Зонд синтезируется с использованием репортерной группы, состоящей из 6-карбоксифлуоресцеина, присоединенного к 5'концу, и гасителя флуоресценции «черная дыра», присоединенного к 3'концу. ПЦР состоит из первичной денатурации в течение 10 минут при 95°C, за которой следует 45 амплификационных циклов денатурации по 15 секунд при 95°C, отжиг праймера при 60°C в течение 30 секунд.

Некоторые системы ПЦР (Birdshell *et al.*, 2014; Johansson *et al.*, 2000; Kugeler *et al.*, 2006), canSNP (канонический одиночный нуклеотидный полиморфизм) (Vogler *et al.*, 2009a), типирование canINDELs (канонические вставки и делеции) (Svensson *et al.*, 2009) и MLVA (анализ мультилокусов с варьирующимся числом tandemных повторов) (Johansson *et al.*, 2004; Vogler *et al.*, 2009b), являются подходящими методами для дифференциации подвидов и генотипов *F. tularensis*.

2. Серологические тесты

Серология в настоящее время используется для диагностики туляремии у людей, но она имеет ограниченную пользу в отношении чувствительных видов животных, которые обычно умирают, прежде чем вырабатываются специфичные антитела. Серология может применяться либо на сыворотках, либо на экстрактах легких (Morner *et al.*, 1988) при эпидемиологических исследованиях животных, устойчивых или относительно устойчивых к инфекции, таких как овцы, крупный рогатый скот, свиньи, лоси, собаки, лисы, кабаны, птицы или заяц-русак в центральной Европе (Gyuranecz *et al.*, 2011; Morner *et al.*, 1988; Otto *et al.*, 2014). Так как не существует антигенных различий между штаммами Типа А и Типа В, менее вирулентный подвид *F. tularensis*, а именно *holarctica*, и его аттенуированный живой вакцинный штамм (LVS, NCTC 10857) можно использовать как антиген во всех серологических тестах.

2.1. Реакции агглютинации

Наиболее часто используемым серологическим тестом является реакция агглютинации. Антигеном является культура *F. tularensis* на среде Френсиса. Культуру собирают через 5-6 дней. Незрелые культуры дают недостаточный выход антигенов.

Колонии суспендируют в 96% спирте, с получением густой суспензии, которую можно хранить от 1 до 7 дней при комнатной температуре. Осадок промывают физиологическим раствором и ресуспендируют в равном объеме физиологического раствора. Порошок кристаллвиолета добавляют к конечной концентрации 0,25%. Бактерии окрашивают при помощи добавления кристаллвиолета и инкубирования при 37°C в течение как минимум 24 часов и не более 7 дней.

После сливания надосадочной жидкости, осадок суспендируют в физиологическом растворе с тимеросалом (мертиолят) или без него при конечной концентрации 1/10000, или с формальдегидом при конечной концентрации 0,5%. Суспензию калибруют с использованием положительных и отрицательных сывороток, и корректируют путем добавления физиологического раствора для получения антигена, который при тестировании на предметном стекле дает хорошо видимые окрашенные реакции агглютинации на прозрачном фоне жидкости.

Следует принимать во внимание возможные перекрестные реакции с *Brucella* и *Legionella* sp. типа S.

2.1.1. Реакция агглютинации на стекле

Это полезный метод для работы в полевых условиях (Guuranecz *et al.*, 2011). При реакции агглютинации на стекле 1 каплю цельной крови (приблизительно 0,04 мл) смешивают с 1 каплей антигена, и реакция считается положительной, если хлопья появляются в течение 1-3 минут при 20-25°C.

2.1.2. Реакция агглютинации в пробирке

Тест проводится в пробирках, содержащих фиксированное количество антигена (0,9 мл) и различные разведения сыворотки, начиная с 1/10, 1/20, 1/40 и т.д. Результаты считывают через 20 минут взбалтывания или через 1 час нахождения на водяной бане при 37°C с последующим хранением при комнатной температуре в течение ночи. Агглютинированный осадок виден невооруженным глазом или желательно с использованием лупы. Положительные пробирки – это те пробирки, в которых имеется прозрачная надосадочная жидкость.

2.1.3. Реакция микроагглютинации

Тест проводится на микротитрационных планшетах. Серийные двукратные разведения сывороток (25 мкл) смешивают с равным объемом инактивированной формалином цельноклеточной суспензии (Chaignat *et al.*, 2014). Результаты считывают после инкубирования при 37°C в течение 18 часов. Агглютинированный осадок виден невооруженным глазом или желательно с использованием лупы. Положительные лунки – те лунки, в которых имеется прозрачная надосадочная жидкость.

2.2. Твердофазный иммуноферментный анализ

Другой серологический тест, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) также позволяет осуществить раннюю диагностику туляремии (Carlsson *et al.*, 1979 Chaignat *et al.*, 2014). Различные антигены, цельные бактерии, а также субклеточные компоненты (например, очищенный липополисахарид) использовались как антигены-приманки против иммуноглобулинов IgA, IgM и IgG; через 2 недели после начала туляремии специфичные антитела можно выявить в сыворотке (Chaignat *et al.*, 2014;

Fulop *et al.*, 1991). IgM сохраняется в течение длительного периода и не может использоваться в качестве признака «свежей» инфекции (Bevanger *et al.*, 1994). Для рутинной диагностики можно использовать цельные термоинактивированные (65°C в течение 30 минут) бактерии в качестве антигена. Бактерии можно нанести на пластмассовые планшеты с использованием обычных методов (Carlsson *et al.*, 1979) с последующими серийными разведениями сыворотки, подлежащей тестированию. Положительные реакции можно увидеть при помощи анти-антител, меченых ферментом. Тест также следует считывать в фотометре с положительными и отрицательными сыворотками в качестве контролей.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

Живой аттенюированный вакцинный штамм *holarctica*, подвид *F. tularensis* (LVS, NCTC 10857) десятилетиями использовался в качестве вакцины против туляремии, особенно для лаборантов, работающих с большим объемом культуры *F. tularensis*. Данная вакцина более не используется в связи с ее общей ограниченной эффективностью и вероятностью возврата к вирулентности, хотя производный вакцинного штамма LVS до сих пор используется для иммунизации людей в эндемичных районах России. Новые вакцины против туляремии находятся в стадии разработки, но еще не лицензированы для использования для людей или животных (Conlan, 2011).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

BARNS S.M., GROW C.C., OKINAKA R.T., KEIM P. & KUSKE C.R. (2005)0 Detection of diverse new Francisella-like bacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 5494–5500.

BEVANGER L., MAELAND J.A. & KVAN A.I. (1994). Comparative analysis of antibodies to Francisella tularensis antigens during the acute phase of tularemia and eight years later. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 1, 238–240.

BIRDSELL D.N., VOGLER A.J., BUCHHAGEN J., CLARE A., KAUFMAN E., NAUMANN A., DRIEBE E., WAGNER D.M. & KEIM P.S. (2014). TaqMan real-time PCR assays for single-nucleotide polymorphisms which identify Francisella tularensis and its subspecies and subpopulations. *PLoS ONE.*, 9, e107964.

CARLSSON H.E., LINDBERG A., LINDBERG G., HEDERSTEDT B., KARLSSON K. & AGELL B.O. (1979). Enzyme-linked immunosorbent assay for immunological diagnosis of human tularemia. *J. Clin. Microbiol.*, 10, 615–621.

CHAIGNAT V., DJORDJEVIC-SPASIC M., RUETTGER A., OTTO P., KLIMPEL D., MÜLLER W., SACHSE K., ARAJ G., DILLER R. & TOMASO H. (2014). Performance of seven serological assays for diagnosing tularemia. *BMC Infect. Dis.*, 14, 234. doi: 10.1186/1471-2334-14-234.

CONLAN JW. (2011). Tularemia vaccines: recent developments and remaining hurdles. *Future Microbiol.*, 6, 391–405.

- ELLIS J., OYSTON P.C., GREEN M. & TITBALL R.W. (2002). Tularemia. *Clin. Microbiol. Rev.*, 15 (4), 631–646.
- FULOP M.J., WEBBER T., MANCHEE R.J. & KELLY D.C. (1991). Production and characterization of monoclonal antibodies directed against the lipopolysaccharide of *Francisella tularensis*. *J. Clin. Microbiol.*, 29, 1407–1412.
- GYURANECZ M. (2012). Tularemia. In: *Infectious diseases of wild birds and mammals in Europe*, First Edition. Gavier-Widen D., Meredith A. & Duff J.P., eds. Wiley-Blackwell Publishing, Chichester, UK, 303–309.
- GYURANECZ M., FODOR L., MAKRAI L., SZOKE I., JÁNOSI K., KRISZTALOVICS K. & ERDÉLYI K. (2009). Generalized tularemia in a vervet monkey (*Chlorocebus aethiops*) and a patas monkey (*Erythrocebus patas*) in a zoo. *J. Diagn. Invest.*, 21, 384–387.
- GYURANECZ M., RIGÓ K., DÁN A., FÖLDVÁRI G., MAKRAI L., DÉNES B., FODOR L., MAJOROS G., TIRJÁK L. & ERDÉLYI K. (2011). Investigation of the ecology of *Francisella tularensis* during an inter-epizootic period. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 11, 1031–1035.
- GYURANECZ M., SZEREDI L., MAKRAI L., FODOR L., MÉSZÁROS A.R., SZÉPE B., FÜLEKI M. & ERDÉLYI K. (2010). Tularemia of European Brown Hare (*Lepus europaeus*): a pathological, histopathological, and immunohistochemical study. *Vet. Pathol.*, 47, 958–963.
- JOHANSSON A., FARLOW J., LARSSON P., DUKERICH M., CHAMBERS E., BYSTRÖM M., FOX J., CHU M., FORSMAN M., SJÖSTEDT A. & KEIM P. (2004). Worldwide genetic relationships among *Francisella tularensis* isolates determined by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *J. Bacteriol.*, 186, 5808–5818.
- JOHANSSON A., IBRAHIM A., GÖRANSSON I., GURYCOVA D., CLARRIDGE J.E. III & SJÖSTEDT A. (2000). Evaluation of PCR-based methods for discrimination of *Francisella* species and subspecies and development of a specific PCR that distinguishes the two major subspecies of *Francisella tularensis*. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 4180–4185.
- KARLSSON K.A., DAHLSTRAND S., HANKO E. & SODERLIND O. (1970). Demonstration of *Francisella tularensis* in sylvan animals with the aid of fluorescent antibodies. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. (B)*, 78, 647–651.
- KEIM P., JOHANSSON A. & WAGNER D.M. (2007). Molecular epidemiology, evolution, and ecology of *Francisella*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1105, 30–66.
- KREIZINGER Z., HORNOK S., DÁN A., HRESKO S., MAKRAI L., MAGYAR T., BHIDE M., ERDÉLYI K., HOFMANN-LEHMANN R. & GYURANECZ M. (2013). Prevalence of *Francisella tularensis* and *Francisella*-like endosymbionts in the tick population of Hungary and the genetic variability of *Francisella*-like agents. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 13, 160–163.
- KUGELER K.J., GURFIELD N., CREEK J.G., MAHONEY K.S., VERSAGE J.L. & PETERSEN J.M. (2005). Discrimination between *Francisella tularensis* and *Francisella*-like endosymbionts when screening ticks by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 7594–7597.
- KUGELER K.J., PAPPERT R., ZHOU Y. & PETERSEN J.M. (2006). Real-time PCR for *Francisella tularensis* types A and B. *Emerging Infect. Dis.*, 12, 1799–1801.

MICHELET L., BONNET S., MADANI N. & MOUTAILLER S. (2013). Discriminating *Francisella tularensis* and Francisellalike endosymbionts in *Dermacentor reticulatus* ticks: evaluation of current molecular techniques. *Vet. Microbiol.*, 163, 399–403.

MORNER T. (1981). The use of FA technique of detecting *Francisella tularensis* in formalin fixed material. *Acta Vet. Scand.*, 22, 296–306.

MORNER T. & ADDISON E. (2001). Tularemia. In: *Infectious Diseases of Wild Mammals*, Third Edition, Williams E.S. & Barker I.K., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 303–313.

MORNER T., SANDSTROM G. & MATTSON R. (1988). Comparison of sera and lung extracts for surveys of wild animals for antibodies against *Francisella tularensis* biovar *palaeartica*. *J. Wildl. Dis.*, 24, 10–14.

OTTO P., CHAIGNAT V., KLIMPEL D., DILLER R., MELZER F., MÜLLER W. & TOMASO H. (2014). Serological investigation of wild boars (*Sus scrofa*) and red foxes (*Vulpes vulpes*) as indicator animals for circulation of *Francisella tularensis* in Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 14, 46-51.

SJÖSTEDT A., ERIKSSON U., BERGLUND L. & TÄRNVIK A. (1997). Detection of *Francisella tularensis* in ulcers of patients with tularemia by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 35, 1045–1048.

SVENSSON K., GRANBERG M., KARLSSON L., NEUBAUEROVA V., FORSMAN M. & JOHANSSON A. (2009). A real-time PCR array for hierarchical identification of *Francisella* isolates. *PLoS ONE*, 4: e8360.

VERSAGE J.L., SEVERIN D.D.M., CHU M.C. & PETERSEN J.M. (2003). Development of a multitarget real-time TaqMan PCR assay for enhanced detection of *Francisella tularensis* in complex specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 41, 5492-5499.

VOGLER A.J., BIRDSELL D., PRICE L.B., BOWERS J.R., BECKSTROM-STERMBERG S.M., AUERBACH R.K., BECKSTROMSTERMBERG J.S., JOHANSSON A., CLARE A., BUCHHAGEN J.L., PETERSEN J.M., PEARSON T., VAISSAIRE J., DEMPSEY M.P., FOXALL P., ENGELTHALER D.M., WAGNER D.M. & KEIM P. (2009a). Phylogeography of *Francisella tularensis*: global expansion of a highly fit clone. *J. Bacteriol.*, 191, 2474–2484.

VOGLER A.J., BIRDSELL D., WAGNER D.M. & KEIM P. (2009b). An optimized, multiplexed multi-locus variable-number tandem repeat analysis system for genotyping *Francisella tularensis*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 48, 140–144.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2007). WHO Guidelines on Tularaemia. WHO Press, Geneva, Switzerland.

*

**

Обратите особое внимание: Имеется Справочная лаборатория МЭБ по туляремии (см. Таблицу в Части 4 данного *Руководства по наземным животным* или обратитесь к веб-сайту МЭБ за самым последним списком: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Для получения дальнейшей информации о диагностических тестах, реагентах и вакцинах против туляремии свяжитесь со Справочной лабораторией МЭБ.