



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ КАЗЁННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
«ВОЛГОГРАДСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ПРОТИВОЧУМНЫЙ ИНСТИТУТ»
(ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора)**

400131, г. Волгоград, ул. Голубинская, 7. Тел.: (8442) 37-37-74. Факс: (8442) 39-33-36. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru.
<http://www.vnipchi.rospotrebnadzor.ru>. ОКПО 01898084, ОГРН 1023403458594, ИНН/КПП 3444051034/344401001

24.03.2020 № 34-30-01/11-517-2020

На № _____ от _____

Руководителям Управлений
Роспотребнадзора в субъектах
Российской Федерации

Анализ взаимодействия с Референс-центром по мониторингу за возбудителем лихорадки Западного Нила в 2019 г. и рекомендации по улучшению работы в 2020 г.

Уважаемые коллеги!

Референс-Центр по мониторингу за возбудителем лихорадки Западного Нила благодарит Вас за сотрудничество и предоставление оперативной и аналитической информации в 2019 г.

Все таблицы, а также анализ эпидемической ситуации по ЛЗН в 2019 г. в России и в мире, информацию об опубликованных Референс-центром материалах по ЛЗН в 2019 г. Вы можете получить в разделе Референс-центра информационного сайта ФКУЗ Волгоградского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора (<http://www.vnipchi.rospotrebnadzor.ru/directions/centre/lixoradka/>).

Высылаем в Ваш адрес порядок взаимодействия в 2020 году и рекомендации Референс-центра по улучшению работы.

Приложение:

1. Порядок взаимодействия с Референс-центром по мониторингу за возбудителем лихорадки Западного Нила, рекомендации по представлению информационно-аналитического материала в 2020 г. на 4 л.
2. Рекомендации Референс-центра по организации эпизоотологического мониторинга на 9 л.
3. Рекомендации Референс-центра по отбору и доставке клинического и биологического материала для проведения лабораторных исследований на 6 л.

С уважением,
директор института

А.В. Топорков

Порядок взаимодействия

с Референс-центром по мониторингу за возбудителем лихорадки Западного Нила,
рекомендации по представлению информационно-аналитического материала.

Во исполнение приказа Роспотребнадзора от 01.12.2017 г. № 1116 «О совершенствовании системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации» напомним порядок взаимодействия с Референс-центром, формы и сроки предоставления информации.

В Референс-центр представляется информация:

1. о каждом случае заболевания ЛЗН на территории – по электронной почте не позднее 24 часов с момента постановки диагноза. К информации прилагается копия эпидемиологического донесения, представленная в Роспотребнадзор, и данные таб. №7;
2. характеристика выявленных случаев заболеваний по результатам проведенных эпидемиологических расследований в объеме таб. № 1-4 – не позднее 10 числа последующего месяца и копия акта эпидемиологического расследования очага инфекционной болезни с установлением причинно-следственной связи, представленного в Роспотребнадзор;
2. за 3, 6, 9 месяцев по всем аналитическим таблицам (№ 1-8); при отсутствии заболеваемости населения – информация в объеме таблиц № 5 («Г», «П»), 6, 8 – к 10 числу последующего за кварталом месяца;
3. по окончании эпидемиологического сезона (суммарная за 10 месяцев) – к 10 ноября. В случаях особых распоряжений Роспотребнадзора и изменения даты представления итоговой информации будет направлено дополнительное извещение. Информация, представляемая Управлением, должна содержать суммарные данные исследований по ЛЗН, включая данные противочумных учреждений Роспотребнадзора (ПЧИ, ПЧС), а также НИИ и учреждений других ведомств, участвующих в работе по мониторингу за возбудителем ЛЗН на контролируемой Управлением территории.
4. Вся информация представляется только по формам таблиц (и приложений к ним), с нарастающим итогом. Образцы таблиц вы можете взять на сайт-странице Референс-центра.

В соответствии с возложенными функциями Референс-центр проводит исследования:

1. Подтверждение диагноза ЛЗН – только в случае, когда в субъекте заболеваемость регистрируется впервые.
2. Углубленные молекулярно-генетические исследования материала для изучения свойств возбудителя, циркулирующего на территории:

2.1. клинического материала от больных с установленным диагнозом ЛЗН (с *IgM* антителами в диагностическом титре):

- нейроинвазивной формы;
- тяжелого клинического течения;
- атипичной симптоматикой болезни;
- с летальным исходом (клинический и аутопсийный материал).

2.2. клинического и биологического (носителей, переносчиков) материала, в котором выявлена РНК ВЗН.

Перед отправкой материала специалист Управления (или по заданию Управления – ответственный исполнитель Центра гигиены и эпидемиологии) должен информировать руководителя Референс-центра о направлении материала по телефону (8 (8442) 39 33 48). В направлении должна быть четко указана цель исследования: либо «для подтверждения диагноза», либо «для углубленных молекулярно-генетических исследований». Результаты исследований с целью верификации высылаются оперативно; изучение свойств возбудителя (вирусологические исследования, полногеномное секвенирование) может занимать длительное время, поэтому Референс-центр оперативно будет извещать о выделении фрагментов РНК ВЗН, подлежащих исследованию, а результат будет представлен по его окончании.

К материалу, поступающему для исследований, предъявляется ряд требований, которые Референс-центр излагает в рекомендациях Приложения 3.

В результате многолетнего мониторинга за циркуляцией возбудителя в субъектах РФ определены территории, где возбудитель (и/или маркеры) был выявлен в носителях и переносчиках в энзоотичном цикле. Иммунная прослойка к ЛЗН у населения и ее значения могут говорить об интенсивности эпидемического процесса. Задачей настоящего этапа является организация действенного мониторинга за возбудителем, обнаружение потенциальных и реальных факторов осложнения эпидемической ситуации, с помощью которых можно прогнозировать возникновение риска (в краткосрочном прогнозе) для принятия управленческого решения по его предупреждению или снижению.

Фактор эпидемиологического риска – это агент или обстоятельство, воздействие которого на эпидемическую ситуацию определяет (вызывает или повышает) вероятность ее осложнения. Факторы риска могут быть биотическими (особенности возбудителя, переносчиков, носителей), абиотическими (климат, гидрогеологические и ландшафтные особенности) и социальными (антропогенными). При зонозах эпидемический процесс в значительной степени зависит от эпизоотического процесса, а эпидемический очаг возникает на основе эпизоотического очага. Оценка эпизоотологической ситуации является неотъемлемой

частью эпидемиологического надзора за ЛЗН, а ее ухудшение является фактором риска возможного осложнения эпидемической ситуации.

В Приложении 2 Референс-центр предлагает рекомендации по организации и проведению эпизоотологического мониторинга.

Значимым фактором, влияющим на принятие управленческого решения по предупреждению или снижению возникшего риска осложнения эпидемической ситуации наряду с другими (материально-техническое обеспечение, укомплектованность кадрами специалистов эпидемиологов и энтомологов и др.) является профессиональная подготовка специалистов.

В сезон 2020г в работу Референс-центра включены плановые и внеплановые (по заданию руководителя Роспотребнадзора) выезды сотрудников в субъекты РФ с целью получения конкретной информации об организации работы по мониторингу за возбудителем и эпидемиологическому надзору за ЛЗН, изучения особенностей проявления ЛЗН на территории с отбором проб клинического и биологического материала и, при необходимости, оказания практической и методической помощи специалистам на рабочем месте. В 2020 г. запланированы командировки в Астраханскую область и Республику Дагестан, а также в зарубежные страны (Республики Беларусь, Казахстан, Кыргызстан). Кроме того, Референс-центр готов оказывать практическую и методическую помощь на рабочем месте специалистам органов и учреждений Роспотребнадзора по вопросам лабораторной диагностики ЛЗН, эпизоотологического мониторинга и организации профилактической и противоэпидемической работы.

Контактные телефоны: 8(8442) 39-33-48, 37-37-74.

Рекомендации Референс-центра
по организации и проведению эпизоотологического мониторинга

Надзор за эпидемическим процессом означает непрерывный сбор, передачу, обобщение и анализ эпидемиологически значимой информации, оценку эпидемической ситуации и тенденций ее развития, разработку на этой основе оптимальных управленческих решений.

Составными частями эпидемиологического надзора за лихорадкой Западного Нила, наряду с другими, входят и два вида мониторинга: эпидемиологический (слежение за показателями многолетней динамики заболеваемости, выявление тенденций ее колебаний, путей заражения и др.) и эпизоотологический (слежение за популяциями теплокровных носителей и членистоногих переносчиков). Система эпизоотологического мониторинга включает функционирование двух основных подсистем: системы наблюдения (за популяциями переносчиков, популяциями носителей и восприимчивых млекопитающих, их экологией, ареалами расселения, степенью интенсивности эпизоотического процесса, экологией возбудителя) и систему анализа.

Основными вопросами эпизоотологии ЛЗН является изучение фауны, численности и распределения животных, в популяции которых циркулирует возбудитель. Как правило, Центры гигиены и эпидемиологии (далее ЦГиЭ), проводящие эпизоотологический мониторинг, не имеют возможности слежения за всеми популяциями носителей и переносчиков в биоценозе очага, а выбирают наиболее эпидемиологически значимые, конкретно для курируемой территории и по показателям, дающим наибольшую информацию в соответствии с поставленной целью. Полное изучение биоценозов, формирующих очаги на территории, проводится в ходе научно-практической работы совместно с научно-исследовательскими институтами и противочумными станциями.

Оптимизация эпизоотологического мониторинга, по данным Референс-центра, наиболее остро стоит в настоящее время в связи со слабой материальной и ресурсной (включая кадровую) базой учреждений Роспотребнадзора. Исходя из этого, Референс-центр рекомендует основными задачами эпизоотологического мониторинга при ЛЗН считать следующие:

1. Проведение ландшафтно-экологического (и эпидемиологического) районирования субъекта и выделение территорий, представляющих повышенный риск заражения населения ЛЗН. Выбор стационарных точек наблюдения должен быть преимущественно на этих территориях.
2. На основе анализа эпизоотологических данных – пространственно-динамическое долгосрочное (на 3-5 лет) и краткосрочное (в эпидсезон) прогнозирование развития эпидемической ситуации.

3. Разработка комплекса действенных профилактических мероприятий (постоянных, с учетом потенциальной эпидемической опасности территории и немедленных при краткосрочном прогнозе риска повышения заболеваемости населения в наступившем эпидемиологическом сезоне).
4. Максимально тесное взаимодействие с учреждениями противочумной и ветеринарной служб и других ведомств, проводящих эпизоотологические наблюдения, эффективный и оперативный обмен эпидемиологически значимой информацией.

При организации эпизоотологического мониторинга необходимо учитывать функциональную структуру, представляющую трехчленную паразитарную систему (возбудитель – вирус; переносчик – комар, клещ; восприимчивые организмы и носители – птицы и млекопитающие животные). Наблюдения должны осуществляться за каждым элементом паразитарной системы.

Организация наблюдения за птицами. Особую значимость при организации надзора за активностью очагов ЛЗН имеют перелетные представители орнитофауны, способные к трансконтинентальным заносам возбудителя с африканских, азиатских и европейских территорий. По мнению европейских ученых потепление привело к продлению сроков гнездования птиц и изменению маршрутов весенних и осенних перелетов, а также мест их летнего и зимнего пребывания. Осваивая новые территории пернатые образуют новые экосистемы, что приводит к распространению возбудителей на новые территории, появлению геновариантов вируса, обладающих новыми свойствами. Таким образом, наблюдение за птицами, а также изучение их зараженности в местах весеннего гнездования является неоспоримым и основным фактором в прогнозировании интенсивности заноса инфекции на территорию и ее эпидемического потенциала.

Наиболее эффективным в эпизоотологическом мониторинге и прогнозе является обследование маркерных видов птиц (представителей семейства врановых в антропогенных и бакланов в природных биоценозах), по результатам которых можно определить ареал ВЗН на территории и уровень активности его циркуляции. Возможность контакта с переносчиками значительно выше у лимнофильных птиц, однако наблюдение и мониторинг необходимо проводить и в популяции синантропных птиц. При прогнозировании можно использовать опыт эпидемиологического надзора в США, когда массовая гибель ворон положена в основу системы раннего оповещения медицинских служб и населения о предстоящем обострении эпидемической ситуации по ЛЗН в отдельном штате.

Наблюдения и учет птиц проводится орнитологами научных, учебных учреждений, природоохранных организаций, работниками заповедников и ветеринарных (орнитологических) станций. Стационарные пункты учета позволяют получать сравнительные данные по многолетней динамике численности птиц. Эти точки наблюдения за

птицами в природных биотопах размещаются на миграционных путях, в урбанизированных биотопах – на берегах водоемов, в парках и на территориях, близких к полигонам ТБО.

В ранневесенний и осенний периоды учитывают птиц на пролете, фиксируя видовой состав и численность мигрантов. Для учета численности местной орнитофауны из оседлых и перелетных птиц работу проводят в период их гнездования. Определяют спектр обитающих видов, их стациальное размещение, распределение и количество гнезд или колоний, обилие самих птиц.

Объектами исследований на ВЗН являются дикие, а также домашние птицы, содержащиеся в открытых условиях. Особенности отлова и подготовки птиц для исследований на ВЗН заключаются, прежде всего в том, что материал должен быть взят или прижизненно (взятие крови), или в кратчайшие сроки после умерщвления особи (пробы внутренних органов).

Наилучшим вариантом организации мониторинга за птицами для учреждений Роспотребнадзора является тесное сотрудничество со специализированными службами (Межрегиональные управления федеральной службы по надзору в сфере природопользования, а также орнитологами, экологами, ветеринарной службой и др.), от которых можно получать интересующую вас информацию и биологический материал для лабораторного исследования. Большую эффективность имеют договора с коммунальными организациями муниципалитетов, проводящих санитарные отстрелы птиц на полигонах ТБО, рыбоводческих хозяйствах и других объектах. Получение информации о массовой гибели птиц (как в природе, так и в подсобных хозяйствах), систематическую поставку биологического материала для исследования на ВЗН можно закрепить в решениях санитарно-противоэпидемической комиссии, мероприятиях Комплексного плана по санитарной охране территории (в разделе ЛЗН) и других документах исполнительной власти территории при обосновании эпидемиологической необходимости.

Организация наблюдения за комарами. Тактика наблюдений на стационарных точках.
С целью осуществления мониторинга за переносчиками в субъекте рекомендовано провести ландшафтное районирование очаговых территорий и выделение участков стационарных наблюдений (в природных и антропоургических очагах, в 1-2 ландшафтных зонах в пределах 3-11 административных районов.).

Наблюдения на стационарных точках необходимо проводить еженедельно (1 раз в 10 дней) с мая (апреля) по октябрь, включая учеты численности, сбор комаров для лабораторных исследований (на наличие РНК ВЗН методом ПЦР) в рекомендуемом Референс-центром объеме не менее 500 особей в неделю.

При каждом учете и сборе необходимо проводить наблюдения за погодными условиями и фенологическими явлениями в природе с фиксацией результатов в журнале.

Четкие, квалифицированные и главное – регулярно осуществляемые наблюдения на стационарных точках в течение многих лет являются основой энтомологического мониторинга и успешного прогнозирования состояния природного очага.

Чтобы установить факт циркуляции ВЗН на территории, где ранее не регистрировались случаи ЛЗН среди людей, нужно исследовать большее число комаров, чем на территориях, эндемичных по ЛЗН. Учитывая это, представляется целесообразным в период с середины июня до середины сентября (3 месяца) исследовать от 6000 до 12000 экз. эффективных переносчиков на территории (комаров рода *Culex*).

Для изучения инфицированности комаров дополнительно, помимо стационарных точек, отбор проб комаров проводится в открытых биотопах, на которых возможен контакт переносчиков с птицами. Отбор проб из подвальных биотопов целесообразен при наличии в подвале продухов, в которые возможен залет особей на дневку/зимовку из природных стаций. Объектами исследований могут быть также комары из зимовочных убежищ (погреба, подполья, колодцы). Отбор комаров зимующих популяций следует проводить с октября по апрель. В закрытых биотопах эффективно использование автомобильного пылесоса или специального аспиратора для летающих насекомых. Традиционные методы сбора комаров (энтомологический сачок, эксгаустер) не позволяют собрать такое количество комаров, которое необходимо для выявления вируса на обследуемой территории. Кроме того, метод Гуцевича (сбор комаров на оголенное предплечье или голень за 20 минут учета) не рекомендуется использовать из-за высокого риска заражения исследователя. Поэтому Референс-центр рекомендует использовать автоматические ловушки с CO₂ и аттрактантами. Ловушки обеспечивают сбор комаров в количестве, достаточном для мониторинга циркуляции ВЗН, и повышают качество мониторинга, поскольку насекомые около суток остаются в ловушках живыми.

РНК ВЗН на территории Российской Федерации обнаружены в комарах видов: *Culex pipiens*, *Culex modestus*, *Aedes vexans*, *Aedes caspius*, *Aedes pulchritarsis*, *Aedes albopictus*, *Anopheles hyrcanus*, *Anopheles maculipennis*, *Anopheles claviger*, *Coquillettidia richiardii*, *Culiseta annulata*, *Uranotaenia unquiculata*.

Наиболее эффективными переносчиками ВЗН человеку являются комары рода *Culex*, способность эффективно заражаться и передавать вирус по данным исследователей у них выше, чем у комаров других родов; кроме того, они питаются на резервуарном хозяине и на человеке. При высокой численности в начале сезона комары рода *Aedes* принимают, в основном, участие в энзоотическом цикле и, при определенных условиях, как и другие рода, могут участвовать в эпидемическом цикле. Поэтому, Референс-центр рекомендует для энтомологов ЦГиЭ в субъектах, не исключая комаров других видов, в большей степени сосредоточить свои усилия

на изучении наиболее эффективных переносчиков в эпидемическом цикле. Рекомендуемое соотношение исследованных проб в сезон: 80 % – комары р. *Culex*, 20 % – комары других родов.

Для специалистов противочумных и других научно-исследовательских учреждений необходимо изучение всех родов (и видов) переносчиков для определения их роли в энзоотичном и эпидемическом циклах передачи ВЗН на каждой конкретной ландшафтно-географической территории и в разных типах очагов.

В Российской Федерации на территориях, где регистрируются заболевания ЛЗН, наиболее многочисленными видами рода *Culex* являются *Cx pipiens* L. и *Cx. modestus* Fic. Мониторинг численности этих видов следует проводить с помощью автоматических ловушек в открытых биотопах ежедекадно с конца мая по октябрь в южных регионах и с июня по сентябрь – в северных. При этом необходимо учитывать биологические особенности переносчиков: *Cx. pipiens* L. активен в сумеречное и ночное время, *Cx. modestus* Fic. – в дневное и сумеречное время. Помимо естественных постоянных водоемов развитие преимагинальных стадий комаров *Cx. pipiens* L. может происходить на приусадебных и дачных участках в искусственных водоемах (бочки, емкости, ведра, небольшие бассейны, декоративные водоемы и т.п.). Располагать автоматические ловушки для мониторинга и отбора проб следует в соответствии с таблицей.

Вид	Расположение точек стационарных наблюдений и точек отбора проб	Единица учета численности
<i>Cx. pipiens</i> L.	Приусадебные и дачные участки в населенных пунктах, берега постоянных замкнутых водоемов	Количество особей за 1 ловушко-ночь (с 20.00 текущих суток до 8.00 следующих)
<i>Cx. modestus</i> Fic.	Берега хорошо прогреваемых освещенных солнцем водоемов, заросшие тростниками (возле уреза воды)	Количество особей за 1 ловушко-день (с 8.00 до 20.00)

Результаты учета численности на каждой стационарной точке ежедекадно регистрируются в журнале отдельно для каждого вида. По истечению каждого месяца наблюдений вычисляется среднемесячный показатель численности (СМП) на каждой точке и общий СМП на курируемой территории (район, область, край, республика). В конце сезона аналогично вычисляется среднесезонный показатель численности (ССП). При наличии результатов наблюдений на стационарной точке за период более 3 лет вычисляется среднемноголетний показатель численности (СМГП), который является основой для прогнозирования развития эпидемической ситуации. Данные сезонных наблюдений за фенологией и численностью членистоногих необходимо вносить в сезонные таблицы, затем автоматически переносить в многолетние накопительные таблицы, после чего эти параметры

необходимо проанализировать (аналитическая подсистема) во взаимосвязи с показателями заболеваемости и климатическими факторами (среднегодовая температура, сумма осадков, влажность воздуха). Полученные данные рекомендуется экстраполировать на сходные по ландшафтно-зональным условиям территории, затем довести до сведения территориальных отделов Управления Роспотребнадзора по субъекту РФ для использования при прогнозировании и принятия управленческих решений.

Важным элементом аналитической подсистемы мониторинга является ежегодное проведение картографического анализа мест заражения населения ЛЗН, видового состава и численности переносчиков, данных выявления маркеров ВЗН. Наряду с этим следует отмечать основные фенологические явления в жизни комаров в эпидемический сезон: первый вылет с зимовок, начало массового вылета, пик численности, появление диапаузирующих самок, конец массовой активности, расчет периода массовой активности в днях, дату регистрации последних комаров в природе, период активности комаров разных родов в днях за сезон. Такая система мониторинга позволяет повысить точность и информативность проводимых исследований, обеспечить систематические ежегодные наблюдения в различных ландшафтных зонах субъекта, провести наблюдения на территории очагов разных типов.

Организация мониторинга за клещами. В циркуляции ВЗН и сохранении его в природных очагах в неблагоприятные периоды участвуют иксодовые, гамазовые и аргасовые клещи в схеме циркуляции вируса: «клещ – птица – клещ». Изоляция вируса как от птиц, добываемых в непосредственной близости от населенных пунктов, так и паразитирующих на них клещей, является доказательством наличия межпопуляционных связей в сложной системе: дикая птица – вирус – комары – синантропные птицы – клещи. Если учитывать круглогодичное сохранение вирусной популяции в клещах, то экологическая схема циркуляции вируса приобретает вид: клещи – вирус – птицы наземного комплекса (преимущественно синантропные) – комары – вирус – дикая птица околородного и водного комплекса. Из известных в отечественной фауне клещей, являющихся паразитами птиц, следует отметить следующие виды: *Argas reflexus*, *A. macrostigmatus*, *A. vulgaris*, *A. latus*, *A. tridentatus*, *A. persicus*, *A. beclensis*, *Ixodes berlesei*, *I. signatus*, *I. putus*, *I. frontalis*, *I. unicavatus*. Личинки и нимфы каждого из этих клещей прокармливаются более чем на 40 видах птиц. Основное значение в циркуляции ВЗН на юге Европейской части России, имеют клещи *Hyalomma marginatum* и *Ornithodoros coniceps*.

По данным зарубежных ученых в результате проведенного исследования птиц, пойманных в районе Средиземного моря (о. Капри, Италия), в месте временной остановки после пересечения Сахары на пути миграции из Африки в Южные регионы Европы, установлено, что

78 различных видов весенних мигрирующих птиц, несли на себе личинок и нимф клещей комплекса *Hyalomma marginatum*, инфицированных ВЗН.

Беспозвоночные нидиколы также могут играть большую роль в сохранении ВЗН и участвовать в трансвариальной и трансфазовой его передаче.

Исследования, проведенные на юге Западной Сибири, показали, что ВЗН регулярно заносится на эту территорию перелетными птицами отряда Воробьинообразные, имеющими потенциальные контакты с природными очагами ЛЗН на юге РФ и за ее пределами. В местах заноса возбудитель может включаться в энзоотический цикл двумя способами. Первый: возбудитель при заносе циркулирует в пределах гнездового сообщества, включающего убежищных гамазовых и (или) иксодовых клещей и птиц (взрослых и птенцов). Вирус в организме клещей способен переживать неблагоприятный (зимний) период. Второй: вирус может попадать при кровососании неполовозрелыми фазами развития пастбищных иксодовых клещей, экологически связанных с птицами, из состава местной фауны иксодид, и передаваться трансфазово. Подобная схема создает потенциальные условия для проявления эпидемической активности природных очагов или псевдоочагов ЛЗН на местах заноса. Таким образом, исследования убежищных гамазовых и иксодовых клещей на наличие ВЗН с последующим его полногеномным секвенированием может дать подробную характеристику очага ЛЗН на территории, определить его границы и возможные изменения.

В природе голодных иксодовых клещей всех активных фаз развития можно обнаружить на травянистой и кустарниковой растительности, поверхности почвы, где они поджидают прокормителя. Клещей собирают на маршрутах, закладываемых в разных биотопах, чередуя редко и часто посещаемые людьми и скотом участки. Пастбища желательно обследовать ранней весной до начала выпаса скота. Летом значительное число личинок и нимф иксодовых клещей можно собрать, обследуя лесополосы и другие места концентрации птиц, а также осматривая их прокормителей: мелких млекопитающих и птиц. Сборы клещей в солнечную погоду проводят в утренние (до наступления жары) и вечерние часы при отсутствии росы и сильного ветра. В пасмурные дни сборы можно вести в дневные часы. При планировании сроков и времени сбора клещей следует учитывать температурные условия, зависящие от климата конкретной местности.

Методы сбора клещей, их транспортировка соответствует общепринятым методикам и могут проводиться параллельно со сбором для исследований на другие инфекции, передающиеся клещами. Для отлова мелких млекопитающих (грызунов, насекомыхоядных), являющихся прокормителями клещей, чаще всего применяют плашки (давилки Геро). В качестве стандартной приманки служат кусочки хлебных корок (примерный объем - 1 см, сдобренные растительным маслом (для полевков желательно использовать кусочки моркови).

Млекопитающих средней величины (сусликов, крыс, пищух, мелких куньих и др.) отлавливают дугвыми капканами N 0 или 1, более крупных (сурков) - капканами N 2 или 3, а также добывают путем отстрела.

Однако, необходимо помнить, что исследования клещей и их прокормителей ни в коей мере не должны заменять основные исследования - комаров и птиц. Лучше всего исследования клещей и мелких позвоночных проводить в рамках научно-практических работ, выполняемых совместно с научно-исследовательскими институтами и противочумными станциями.

Мониторинг за маркерными видами животных. Эффективным направлением в эпизоотологическом мониторинге является обследование маркерных видов сельскохозяйственных животных (лошадей, крупного рогатого скота) и получение оперативной информации о массовых заболеваниях животных.

У млекопитающих вирус сравнительно недолго присутствует в крови, но может длительное время сохраняться в центральной нервной системе. Например, у золотистых хомяков вирус сохраняется в ЦНС 86 дней; а при хронической почечной инфекции, вирус выводится из организма с мочой в течение восьми месяцев.

Таким образом, даже если вирусемия у большинства млекопитающих (кроме белок, бурундуков, хомяков, кроликов, кошек, аллигаторов) недостаточна для заражения комаров, они могут быть источниками инфекции для хищников и мусорщиков (птиц и других позвоночных) и поддерживать эпизоотический очаг через алиментарный путь заражения.

Учеными из США проведено изучение эпидемиологической значимости наиболее приближенных к человеку животных - кошек и собак и было доказано, что они легко заражаются ВЗН (как трансмиссивным, так и алиментарным путями), могут тяжело болеть вплоть до летального исхода. Уровень вирусемии у собак низок и, можно предположить, что они не могут служить источником заражения комаров. В отличие от них, у кошек с тяжелой клинической формой заболевания уровень вирусемии достаточен для их заражения.

Зараженные мелкие животные могут служить в качестве важного источника инфекции для других более крупных плотоядных при их поедании.

Материал для исследований и, главное, своевременную информацию о выявлении больных ЛЗН животных необходимо получать от органов и учреждений ветеринарной службы, сельхознадзора и профильных отделов (комитетов) исполнительной власти территорий при проведении соответствующей организационной работы Управлениями Роспотребнадзора субъектов. При заключении соглашений с хозяйствующими организациями, проводящими санитарные отстрелы бродячих животных, можно получать биологический материал для исследований при проведении научно-практической работы.

Сбор погадок хищных птиц и млекопитающих.

Погадки хищных птиц могут служить ценным материалом для серологических и молекулярно-биологического исследований по обнаружению не только текущих эпизоотий, но и в целях ретроспективной оценки состояния территорий. В частности, исследование погадок, собранных в одних и тех же местах через определенные промежутки времени и в разные сезоны, позволяет в известной степени характеризовать различия в течении эпизоотий в разные годы и сезонные особенности их развития.

Исследованию погадок хищных птиц, как правило, должно предшествовать определение их видовой принадлежности. Наиболее массовые сборы погадок осуществляют рядом с гнездами хищных птиц. В любых ландшафтах перспективен сбор погадок у телеграфных столбов и опор линий электропередач, особенно в тех случаях, когда эти линии проходят через безлесные пространства. При этом сборы свежих погадок под столбами бывают наиболее результативными осенью, во время пролета хищных птиц, особенно в годы с высокой численностью грызунов.

Кроме погадок птиц для лабораторных исследований используют также экскременты хищных млекопитающих, в отдельных случаях и экскременты фоновых видов носителей (грызунов, зайцеобразных), а также пробы субстрата из их нор (в первую очередь из гнездовых и кормовых камер).

Резюме

Все результаты учета, какими бы методами они ни были достигнуты, являются сугубо выборочными оценками, основанными на анализе ничтожно малой части от всей совокупности населения вида (видов) на контролируемой территории. Это обязывает к очень внимательному проведению экстраполяции полученных данных на окружающую местность с детальной дифференциацией последней по сходным условиям существования членистоногих и животных. При обсуждении результатов учета численности конкретных видов указывают соответствующие методы или их модификации, использованные для получения этих материалов. Четко организованный эпизоотологический мониторинг позволит выяснить современное состояние природных и антропоургических очагов на конкретных территориях, динамику изменений в них под влиянием биотических, социальных и абиотических факторов; осуществить прогнозирование риска повышения заболеваемости населения уже в текущем сезоне, а также принять своевременные и адекватные организационные и профилактические меры для снижения потенциальной опасности заражения населения ВЗН.

Рекомендации Референс-центра
по отбору, транспортировке клинического и биологического материала для
проведения лабораторных исследований

1. Биологический материал. Членистоногие. Отбор проб и транспортировка биологического материала осуществляется в соответствии с требованиями Санитарных правил СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)», СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности», Методических указаний МУ 3.1.1027-01 «Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию членистоногих-переносчиков возбудителей природно-очаговых инфекций», МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории» (утв. и введены в действие Главным государственным санитарным врачом РФ 23 декабря 2005 г.), МУК 4.2.3009-12 «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики лихорадки Западного Нила для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней». Методы отбора проб кровососущих членистоногих (комаров и клещей) указаны в МУ 3.1.1027-01 «Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию членистоногих переносчиков возбудителей природно-очаговых инфекций». Помимо этого, для отбора проб комаров в природных условиях рекомендуется использовать автоматические ловушки с автономными источниками питания (Mosquito Magnet Executive, ЛовКом, BG-sentinel и т.п.).

Транспортировка. Эксгаустер, мешки из автоматических ловушек с живыми комарами помещают в термоконтейнер с хладагентами и доставляют в территориальную лабораторию в течение суток.

Отловленных сачком комаров перемещают в садок, обтянутый марлей (в качестве садка может быть использован проволочный или пластиковый остов в виде куба или цилиндра без дна) и доставляют в лабораторию в термоконтейнере.

Отобранных клещей, помещают в стеклянную или пластиковую пробирку с ватно-марлевой пробкой. После заполнения в пробирку добавляют листочки злаковых растений для сохранения благоприятной для клещей влажности.

Определение видового состава отловленных членистоногих осуществляют в лаборатории до исследований. Перед определением комаров помещают на 5-7 минут в морозильную камеру для обездвиживания. При невозможности быстрого проведения определения видов, живых членистоногих можно хранить в холодильнике: комаров при

температуре от + 2°C до + 8°C не более 48 часов, клещей в пробирках – при температуре от + 2°C до + 8°C в течение месяца.

Членистоногих, после определения вида, сразу же фасуют в микроцентрифужные полипропиленовые пробирки с крышками объемом 2 мл или в криопробирки объемом 2 мл с завинчивающейся крышкой и уплотнительным кольцом.

Формирование пулов проводится следующим образом: в 1 пробирку помещают членистоногих одного вида: комаров – до 30 экземпляров, клещей голодных – по 5-7 экземпляров, полунапитавшихся – по 2-3 экземпляра, напитавшихся – по 1 экземпляру.

Расфасованных членистоногих доставляют в лабораторию. Хранение проб до отправки допускается в морозильной камере при температуре – 16°C не более 1 недели, далее – при температуре – 70°C. От момента сбора членистоногих до проведения лабораторных исследований допускается лишь однократное замораживание - оттаивание материала.

Биологический материал (полевой). Птицы и млекопитающие.

Лабораторное исследование полевого материала проводится вирусологическим, серологическим и молекулярно-биологическим методами. Материалом для исследований служат: кровь, головной, спинной мозг, внутренние органы (печень, селезенка, почки). Подготовка образцов проводится в соответствии с инструкциями, прилагаемыми к тест-системам для постановки ИФА, РАО, ОТ-ПЦР.

Особенности отлова и подготовки животных для исследований на ВЗН заключаются, прежде всего в том, что материал должен быть взят прижизненно (взятие крови), или в кратчайшие сроки после умерщвления особи (пробы внутренних органов) с максимальным соблюдением правил, обеспечивающих стерильность взятых проб. Чтобы исключить гибель особи при заборе крови, возможное количество взятой крови не должно превышать 5-9 % от ее общего объема. От убитой особи кровь можно взять только в течение 3-5 мин после отстрела. Для проведения серологических исследований на инфицированность позвоночных животных требуется, как правило, 1,0—1,5 мл сыворотки, которую в таком объеме получают из 4-5 мл крови. Однако у мелких грызунов цельной крови обычно удается взять не более 1,5-2,0 мл. Поэтому, если нет задачи исследовать животных индивидуально, в пробу с одной точки отлова объединяют 2—3 особи одного вида, пола и желательно возраста.

После взятия крови убитого животного помещают в бязевый мешочек (для последующего сбора эктопаразитов) и в течение 2 часов доставляют к месту забора проб органов.

Подготовка суспензий органов животных проводится общепринятым методом с использованием раствора для разведения образцов, заложенного в диагностические тест-

системы. При заборе органов и приготовлении суспензий в полевых и лабораторных условиях необходимо принять меры для исключения перекрестной контаминации: для получения и обработки проб от каждого животного используют отдельный комплект инструментов и одноразовую посуду.

В случае необходимости длительного хранения пробы замораживают и хранят при температуре от -20 до -70 °С.

Биологический материал трупов людей (секционный материал).

В Референс-центр доставляется секционный материал в случае смерти больного, которому при жизни был выставлен клинический диагноз ЛЗН без выписки из стационара с документом о выздоровлении. Отбор проб секционного материала проводит патологоанатом или судмедэксперт.

Пробы внутренних органов (печень, легкие, селезенка, почки, головной и спинной мозг) отбирают из нескольких участков, как подвергшихся изменениям, так и из участка рядом расположенной ткани, которая выглядит неизменной. При наличии распада ткани основное внимание обращают на пограничную зону. Пробы различных органов отбирают в объеме не менее 2 - 3 см³. Отбор секционного материала необходимо проводить как можно быстрее после смерти больного (не позднее 20 ч при комнатной температуре).

Микробиопат (пунктат)/микроаутопат помещают в микропробирки с закручивающимися крышками или пробирки объемом 1,5 мл с защелкой с питательной средой для культивирования вирусов (199, Игла, DMEM) с добавлением 10000 ЕД/мл пенициллина, 10 мг/мл стрептомицина, 25 мкг/мл амфотерицина. Пробирки опускают вместе с направлением в емкость для транспортировки. Референс-центр рекомендует одновременно высылать и клинический материал, полученный еще при жизни больного. Материал должен доставляться в лабораторию при t от 0 до +8°С. Направление для исследования заполняется по установленной форме с обязательным указанием: даты и времени смерти, даты и времени отбора материала, вида материала, клинического и патологоанатомического диагнозов, результатов исследований на ЛЗН при жизни.

3. Клинический материал.

Отбор проб для серологической диагностики (определение антител класса M и G к вирусу Западного Нила). Материалом для исследования служит сыворотка крови.

Специфические IgM антитела появляются в крови в среднем через неделю после заболевания, достигая наибольшей концентрации ко 2 неделе. При ЛЗН с поражением ЦНС специфические IgM в спинномозговой жидкости могут выявляться на 2–3 дня раньше, чем в

плазме и сыворотке крови. В отдельных случаях наблюдается персистенция IgM антител в крови реконвалесцентов ЛЗН до 12 и более месяцев.

Для серологического исследования необходимо двукратное взятие крови: первая проба берется в острой стадии болезни, вторая через 10-14 дней.

Кровь отбирают с соблюдением правил асептики из локтевой вены в стерильную пробирку без антикоагулянта в количестве 3-5 мл, закрывают стерильной пробкой; помещают вместе с направлением в герметичную тару; доставляют в лабораторию первичной диагностики в термосе или сумке-холодильнике при температуре от + 2°C до + 8°C в течение 24 часов от момента забора. Возможно хранение крови в холодильнике при температуре от + 2°C до + 8°C в течение не более 72 часов.

Для предотвращения гемолиза перед хранением и транспортировкой можно приготовить сыворотку. Сыворотку крови хранят в стерильных пробирках при температуре +4°C и транспортируют в лабораторию, которая осуществляет первичную диагностику в термосе или сумке-холодильнике с хладагентами при t от + 2°C до + 8°C.

Исследования методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) на обнаружение РНК ВЗН. Материалом для проведения ОТ-ПЦР служит: цельная кровь (с добавлением антикоагулянта), спинномозговая жидкость (СМЖ), моча, секционный материал (мозг, печень, селезенка, почки, легкие).

Наиболее достоверным методом диагностики является метод ОТ-ПЦР, с помощью которого детектируется вирусная РНК. В связи с коротким периодом вирусемии у больных ЛЗН РНК вируса выявляется методом ОТ-ПЦР на самых ранних этапах болезни (в среднем до 10 дня). Вирусная РНК может длительно сохраняться в моче (в течение нескольких недель).

Забор крови для исследования производят натошак из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8-1,1 мм) в одноразовый шприц объемом 5 мл или специальную вакуумную систему типа «Venoject» (с ЭДТА), «Vacuette» (сиреневые крышки – 6% ЭДТА).

При взятии в шприц кровь из него аккуратно (без образования пены) переносят в одноразовую пластиковую пробирку с антикоагулянтом. В качестве антикоагулянта используется 3,8% раствор цитрата натрия или 6% раствор ЭДТА. Соотношение крови и антикоагулянта составляет при использовании 6% раствора ЭДТА 20:1 или при 3,8% раствора цитрата Na – 9:1. Пробирку закрывают крышкой и аккуратно переворачивают несколько раз (8-10 раз) для перемешивания с антикоагулянтом. Гепарин в качестве антикоагулянта использовать нельзя.

Каждую пробирку маркируют этикеткой с указанием ФИО больного, возраста, даты начала заболевания, вида материала, времени и даты его забора, затем помещают вместе с направлением в герметичную тару (металлический или пластиковый пенал) для транспортировки.

Забранный материал (кровь с антикоагулянтом) до транспортировки в лабораторию, осуществляющую первичную диагностику, может храниться при температуре + 2°C до + 8°C; время хранения и транспортировки в лабораторию не должно превышать 8 часов от момента забора материала. Транспортировка материала осуществляется в термоконтейнере с хладагентами. Замораживание образцов цельной крови не допускается.

Ликвор забирают по общепринятой методике, переносят в одноразовую микропробирку (без добавления антикоагулянта) с закручивающейся крышкой или пробирку объемом 1,5 мл с защелкой. Возможно хранение ликвора до транспортировки в лабораторию, осуществляющую первичную диагностику, при температуре + 2°C до + 8°C 8 часов от момента забора материала.

Моча (30 мл) собирается в одноразовую, стерильную посуду. При невозможности исследования материала в течение суток, материал переносится в пробирку, в которую добавляют глицерин (10% от объёма пробы), перемешивают для равномерного распределения и замораживают: при температуре – 20° С – для хранения в течение 7 дней; при температуре – 70°С – длительно. Допускается лишь однократное замораживание-оттаивание материала.

Исследования вирусологическим методом для выделения и характеристики ВЗН.

На вирусологическое исследование поступает материал, в котором обнаружена РНК ВЗН. Материалом для исследования служит: цельная кровь (с добавлением 6% раствора ЭДТА), спинномозговая жидкость (СМЖ), секционный материал (мозг, печень, селезенка, почки, легкие), биологический материал от носителей и переносчиков.

Транспортировка клинического и биологического материала в Референс-центр

В Референс-центр доставляется клинический материал для проведения углубленных молекулярно-генетических исследований от больных с установленным диагнозом ЛЗН (нейроинвазивной формы, атипичной симптоматикой, тяжелым клиническим течением заболевания) и биологический материал, в котором выявлена РНК ВЗН Центрами гигиены и эпидемиологии после подтверждения диагноза. В случаях, когда ЛЗН выявлена на территории субъекта впервые, ЦГиЭ направляет клинический материал для подтверждения результатов исследования с указанием метода исследования, названия диагностической

тест-системы, производителя, серии, срока годности. Медицинскими организациями доставляется биологический материал умерших от ЛЗН больных.

Правила доставки. Материал от больного помещают в емкость (плотно закрывающиеся пластмассовые пробирки или флаконы с завинчивающимися крышками, проверенные на герметичность). Для транспортировки плотно закрытый верхний конец промаркированной емкости вместе с крышкой герметизируют различными пластификаторами (парафин, парафилм и др.). Емкость с клиническим материалом помещают в плотную упаковку подходящего размера с ватой (или другим гигроскопичным материалом) в количестве достаточном для адсорбции всего образца в случае его протечки; упаковка должна быть герметично заклеена или запаяна. Запрещается упаковывать образцы клинического материала от разных людей в одну упаковку. В отдельный полиэтиленовый пакет вкладывают бланк направления. Герметично закрытые упаковки помещают в контейнер для транспортировки биологических материалов. Контейнер помещают в пенопластовый термоконтейнер с охлаждающими термоэлементами. Не допускается замораживание-оттаивание материала.

Референс-центр рекомендует пересылать биологический материал в пенопластовом термоконтейнере с охлаждающими термоэлементами, либо пластиковых криопробирках, помещенных в жидкий азот (в сосуд Дьюара), либо в пенопластовый термоконтейнер (толщина стенки не менее 3 см) с сухим льдом. Объем сухого льда должен быть достаточен для его сохранения в течение времени пересылки (до 5 дней).

Термоконтейнер с упакованными в него емкостями, содержащими биоматериал, обертывают бумагой (обшивают материалом), опечатывают сургучной печатью или пломбируют. На адресной стороне ящика посылки должен быть размещен особый знак (ярлык с отметкой). На посылку оформляется справка на разрешение транспортировки спецгруза для служб контроля.

Транспортирование проб клинического (биологического) материала между организациями осуществляется почтовой связью (через экспресс-почту) или нарочными. Организация-отправитель обязана сообщить любым видом срочной связи организации-получателя дату и вид транспорта, которым отправлен материал для исследования. Срок транспортировки материала должен быть не более 3-4 дня с соблюдением «холодовой» цепи.

На содержимое упаковки составляют сопроводительное письмо на официальном бланке организации и акт упаковки в двух экземплярах. Первые экземпляры указанных документов помещают в упаковку с биологическим материалом. Копии документов остаются у отправителя. Референс-центр после получения материала составляет акт вскрытия упаковки и вместе с письмом, подтверждающим получение биоматериала, направляет акт в организацию-отправитель.

Оформление направления материала на исследование. На каждую отправляемую в Референс-центр пробу заполняют направление по установленной форме. Материал от больного ЛЗН обязательно должен содержать информацию о дате заболевания, дате госпитализации, дате взятия материала, все методы диагностики, ранее проведенные больному и их результаты, краткий эпидемиологический анамнез, предварительный клинический диагноз; для биологической пробы (членистоногие) обязательна информация: род, вид, место забора (координаты), время, дата отбора и особые условия (метод отбора, способ хранения и др.), результаты исследований. Направляемую пробу сопровождают письмом на имя руководителя учреждения, в котором указывают вид направляемого материала, количество образцов и цель исследования; письмо подписывает руководитель направившего учреждения.