

**Федеральное бюджетное учреждение науки
«Омский научно-исследовательский институт
природно-очаговых инфекций»
Федеральной службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и благополучия
человека**

**АЛГОРИТМ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ
РИККЕТСИОЗОВ ГРУППЫ КЛЕЩЕВОЙ ПЯТНИСТОЙ
ЛИХОРАДКИ**

Методические рекомендации

Омск 2019

УДК 616.98:579.881.11 - 07
ББК 52.64
Ш 93

Рекомендовано к изданию, решением
учёного совета ФБУН «Омский НИИ
природно-очаговых инфекций»
Роспотребнадзора
(протокол № 10 от 27 ноября 2019г.)

Рецензент:

д.м.н., профессор кафедры микробиологии,
вирусологии и иммунологии ОмГМУ С.Н. Шпынов

Автор:

Штрек Сергей Владимирович –
ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ОмГМУ.

Штрек С.В.

Ш 93 Алгоритм лабораторной диагностики риккетсиозов группы
клещевой пятнистой лихорадки: Методические рекомендации /
С.В. Штрек – Омск: Издательский центр КАН, 2019. – 12 с.

ISBN 978-5-907156-33-3

В методических рекомендациях представлен алгоритм применения комплекса лабораторных методов: серологических для выявления антител к антигенам риккетсий и молекулярно-биологических для выявления и идентификации риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки, распространённых на территории Российской Федерации, показана схема проведения основных этапов анализа с применением зарегистрированных и экспериментальных тест-систем.

Предназначены для специалистов органов управления и организаций Роспотребнадзора и учреждений здравоохранения.

УДК 616.98:579.881.11 - 07
ББК 52.64

ISBN 978-5-907156-33-3

© Штрек С.В., 2019

СОДЕРЖАНИЕ

1	Введение	4
2	Нормативные ссылки	5
3	Алгоритм лабораторного обследования больных с подозрением на риккетсиозы группы клещевой пятнистой лихорадки	6
4	Заключение	12

1. ВВЕДЕНИЕ

Согласно санитарно-эпидемиологическим правилам СП 3.1.3310-15 «Профилактика инфекций, передающихся иксодовыми клещами» обследованию подлежат лица, обратившиеся за медицинской помощью с клиническими и эпидемиологическими показаниями на инфекции, передающиеся иксодовыми клещами. Медицинские работники обязаны обеспечить лабораторное исследование на следующие инфекции: клещевой вирусный энцефалит, Крымская геморрагическая лихорадка, иксодовые клещевые боррелиозы, туляремия, гранулоцитарный анаплазмоз человека, моноцитарный эрлихиоз человека, лихорадка Ку, клещевые риккетсиозы и другие инфекции. Относительно клещевых риккетсиозов, вызываемых риккетсиями группы КПЛ на сегодняшний день в МКБ-10 предусмотрены следующие варианты кодировки: А 77.0 – пятнистая лихорадка, вызываемая *Rickettsia rickettsii* (Пятнистая лихорадка Скалистых гор), А 77.1 - пятнистая лихорадка, вызываемая *Rickettsia conorii* (африканский клещевой тиф, приступообразная лихорадка, индийский клещевой тиф, кенийский клещевой тиф, марсельская лихорадка, средиземноморская клещевая лихорадка), А 77.2 - Пятнистая лихорадка, вызываемая *Rickettsia sibirica* (североазиатская клещевая лихорадка, сибирский клещевой тиф), А 77.3 - Пятнистая лихорадка, вызываемая *Rickettsia australis* (квинслендский клещевой тиф), А 77.8 - Другие пятнистые лихорадки и А77.9 – Пятнистая лихорадка неуточненная (клещевой тиф, БДУ). Для верификации диагноза «клещевой риккетсиоз» необходимо исследование лабораторными методами. В связи с отсутствием на сегодняшний день оптимального алгоритма лабораторной диагностики, верификация диагноза затруднена.

На основании наблюдаемых клинических симптомов у пациентов с диагнозом «Сибирский клещевой тиф», анализа диагностической эффективности серологических и молекулярно-биологических методов исследования, распространенности возбудителей в переносчиках и обобщенных литературных данных был разработан алгоритм лабораторного обследования больных с подозрением на клещевые риккетсиозы группы КПЛ. Использование определенной схемы исследования зависит от сроков забора материала, тяжести клинического течения заболевания, наличия переносчика и оснащения лаборатории необходимыми тест-системами и оборудованием. В ранние сроки после присасывания клеща наиболее приемлемы молекулярно-биологические методы, с помощью которых решаются две задачи: выявление ДНК *Rickettsia species* или идентификация патогенных риккетсий группы КПЛ. Серологические методы для обнаружения IgM-антител к риккетсиям эффективно использовать с 4 по 7 день после начала заболевания, которые позволят подтвердить наличие активного инфекционного процесса. Применение сертифицированной тест-

системы для выявления IgM антител к *R. conorii* позволяет верифицировать СКТ на 10-14 день от начала заболевания в 72% (ДИ₉₅58÷88%) случаев. Данный алгоритм позволит усовершенствовать диагностику клещевых риккетсиозов на ранних этапах заболевания и оптимизировать затраты на лабораторную диагностику этой группы болезней путем дифференцированного подхода к забору материалов от больных, в зависимости от предварительного диагноза и длительности заболевания. Разработанный алгоритм основан на существующих на данный момент экспериментальных методах и диагностических тест-системах, зарегистрированных в федеральной службе по надзору в сфере здравоохранения.

2. НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

2.1 СП 3.1.3310-15 «Профилактика инфекций, передающихся иксодовыми клещами».

2.2 СП 3.1/3.2.1379-03 «Общие требования по профилактике инфекционных и паразитарных болезней».

2.3 СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV группы патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

2.4 СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II группы патогенности (опасности)». – Госкомсанэпиднадзор РФ. – М., 2003.

2.5 СП 1.2.036-95 «Порядок учёта, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности». Госкомсанэпиднадзор РФ. – М., 1995.

2.6 МУ 3.1.3012-12 «Сбор, учёт и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих в природных очагах опасных инфекционных болезней».

2.7 МУ 1.3.1794-03 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I-II групп патогенности». – Минздрав России, 2003.

2.8 МУ 1.3.1888-04 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности». – Минздрав России, 2004.

2.9 МР «Эпидемиологический надзор за клещевым риккетсиозом. Иммунодиагностика заболевания и методы выявления возбудителя», утв. Минздравом СССР от 22.10.91 №15-6/28.

2.10 МУ 3.1.1755-03 «Организация эпидемиологического надзора за клещевым риккетсиозом».

2.11 МР «Профилактика клещевых риккетсиозов» от 21.11.2013.

3. АЛГОРИТМ ЛАБОРАТОРНОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ БОЛЬНЫХ С ПОДОЗРЕНИЕМ НА РИККЕТСИОЗЫ ГРУППЫ КЛЕЩЕВОЙ ПЯТНИСТОЙ ЛИХОРАДКИ

День	Материал для исследования	Пробоподготовка	Методы диагностики	Результаты	Рекомендации
1. Молекулярно-биологические методы исследования для выявления ДНК <i>Rickettsia species</i>					
1-3-й день после присасывания клеща.	Клещ.	1. Предварительная промывка клещей от загрязнений веществами, использованными для удаления присосавшихся особей. В случае, если клещ не загрязнён, можно сразу приступить к приготовлению суспензии. 2. Приготовление суспензии клещей различными способами, оптимальный способ с использованием гомогенизатора.	ПЦР в режиме реального времени с использованием тест-систем «РеалБест ДНК <i>Rickettsia species</i> » (ЗАО «Вектор-Бест»).	Положительный. Выявление ДНК <i>Rickettsia species</i> .	Рекомендуется исследование цельной крови, смыва первичного аффекта или плазмы крови тест-системой «РеалБест ДНК <i>Rickettsia species</i> ».
				Отрицательный.	Окончание исследования, выдача отрицательного результата.
	Цельная кровь. Плазма крови. Смыв с первичного аффекта.		ПЦР в режиме реального времени с использованием тест-систем «РеалБест ДНК <i>Rickettsia species</i> » (ЗАО «Вектор-Бест»).	Положительный. Выявление ДНК <i>Rickettsia species</i> .	Рекомендуется серологическое исследование в динамике.
				Отрицательный.	Окончание исследования, выдача отрицательного результата.

День	Материал для исследования	Пробоподготовка	Методы диагностики	Результаты	Рекомендации
	Биоптат.		ПЦР с детекцией в электрофоретическом геле используя праймеры к гену цитратсинтетазы (<i>gltA</i>).	Положительный. Выявление ДНК <i>Rickettsia species</i> .	Рекомендуется серологическое исследование.
				Отрицательный.	Окончание исследования, выдача отрицательного результата.
2. Молекулярно-биологические методы исследования для идентификации патогенных риккетсий группы КПЛ					
1-3-й день после присасывания клеща.	Клещ. Цельная кровь. Плазма крови. Смыв с первичного аффекта. Биоптат.	Пробоподготовка смотреть в таблице раздел 1.	ПЦР в режиме реального времени с использованием тест-систем «РеалБест ДНК <i>Rickettsia sibirica</i> / <i>Rickettsia heilongjiangensis</i> » (ЗАО «Вектор-Бест»).	Положительный. Выявлена и определена ДНК до вида риккетсий.	Рекомендуется серологическое исследование.
				Отрицательный.	Рекомендуется исследование в ПЦР с праймерами к генам <i>gltA</i> , <i>ompA</i> , <i>ompB</i> , <i>16S rRNA</i> , <i>sca4</i> .
				Положительный. Выявлена и определена ДНК до вида риккетсий.	Рекомендуется серологическое исследование.
			ПЦР+секвенирование по Сэнгеру с праймерами к генам <i>gltA</i> , <i>ompA</i> , <i>ompB</i> , <i>16S rRNA</i> , <i>sca4</i> .	Отрицательный.	Окончание исследования, выдача отрицательного результата.
3. Серологические методы исследования					
4-9-й день заболевания.	Сыворотка крови.	Исследуемая сыворотка должна быть свежей или	Реакция связывания комплемента.	Положительный (титр 1:20 и выше).	С целью дифференцирования текущего заболевания от ранее

День	Материал для исследования	Пробоподготовка	Методы диагностики	Результаты	Рекомендации
		сохранившейся в замороженном состоянии при температуре -20°C.		Сомнительный (титр 1:10).	перенесённого рекомендуется исследование сыворотки взятой на 10-20-й день заболевания.
				Отрицательный.	Рекомендуется исследование сыворотки взятой на 10-20-й день заболевания.
			Иммуноферментный анализ на наличие IgM.	Положительный.	Диагноз подтверждён, Рекомендуется исследование сыворотки взятой на 10-20-й день заболевания.
				Сомнительный	Рекомендуется исследование сыворотки взятой на 10-20-й день заболевания.
				Отрицательный	
10-20-й день заболевания.	Сыворотка крови.	Исследуемая сыворотка должна быть свежей или сохранившейся в замороженном состоянии при температуре -20°C.	Реакция непрямой иммунофлюорисценции с различными корпускулярными антигенами риккетсий.	Положительный (титр 1:20 и выше)	С целью дифференцирования текущего заболевания от ранее перенесённого рекомендуется исследование сыворотки взятой на 20-30-й день заболевания.
				Сомнительный (титр 1:10)	
				Отрицательный	Рекомендуется исследование сыворотки взятой на 10-20-й день заболевания.
			Реакция связывания комплемента.	Положительный (титр 1:20 и выше).	Положительная динамика антител будет свидетельствовать о текущем заболевании.
				Сомнительный (титр 1:10).	Рекомендуется исследование в ИФА на наличие IgM и IgG. При

День	Материал для исследования	Пробоподготовка	Методы диагностики	Результаты	Рекомендации
				Отрицательный.	отсутствии данной тест-системы окончание исследования, выдача отрицательного результата.
			Иммуноферментный анализ на наличие IgM и IgG.	Положительный (IgM, IgG).	Окончание исследования, выдача положительного результата
				Положительный (IgM) и сомнительный (IgG).	
				Сомнительный (IgM, IgG).	Окончание исследование, выдача отрицательного результата.
				Отрицательный (IgM, IgG).	
21-30-й день заболевания			Реакция непрямой иммунофлюорисценции с различными корпускулярными антигенами риккетсий.	Положительный (титр 1:20 и выше).	Положительная динамика антител будет свидетельствовать о текущем заболевании .
				Сомнительный (титр 1:10).	Рекомендуется исследование в ИФА на наличие IgM и IgG. При отсутствии данной тест-системы окончание исследования, выдача отрицательного результата.
				Отрицательный.	

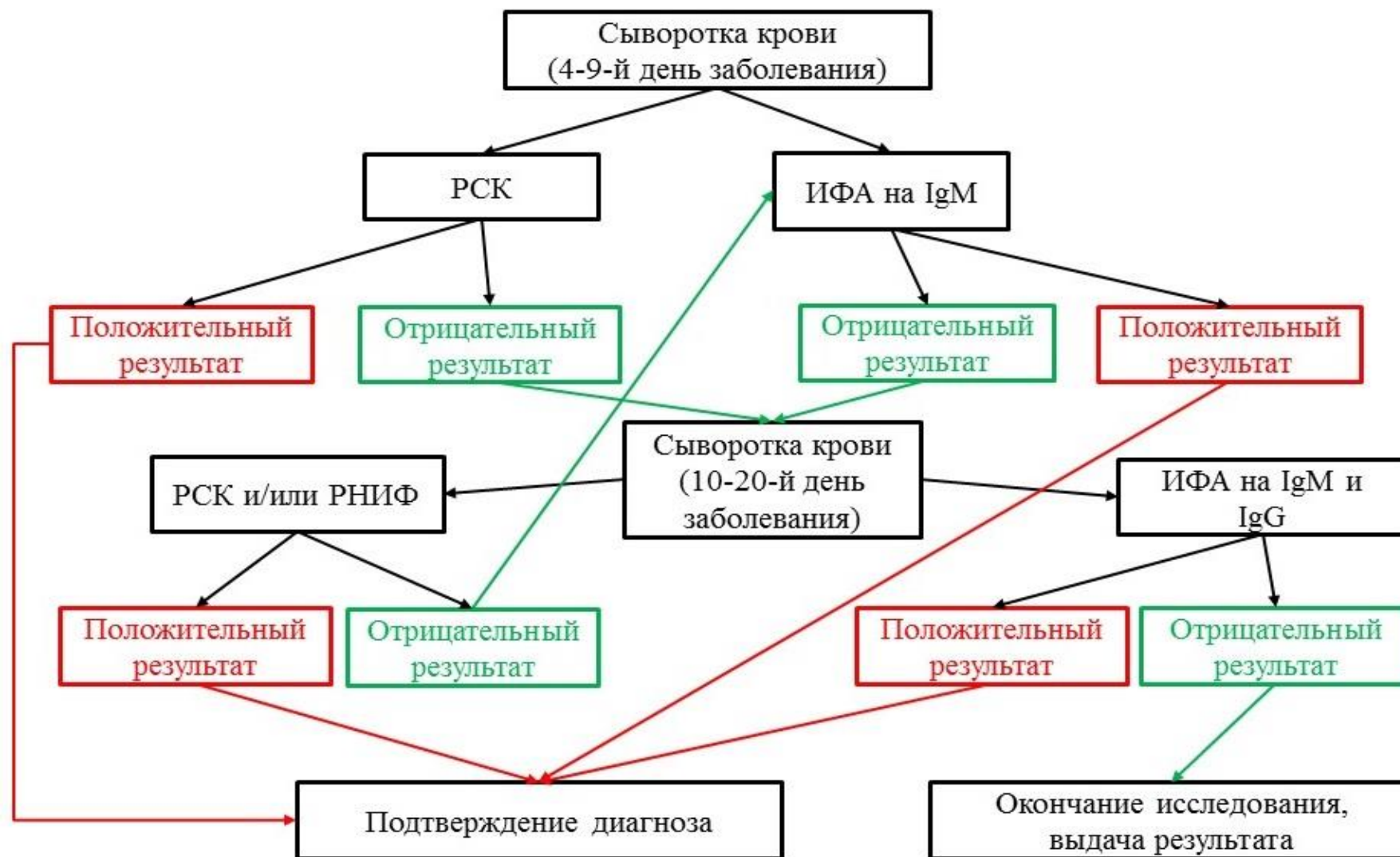


Рисунок 1. Алгоритм серологического исследования сывороток крови от пациентов с подозрением на клещевые риккетсиозы.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для лабораторной верификации диагноза СКТ наиболее приемлемо применение серологических методов, из которых наиболее чувствительным является ИФА, позволяющий выявить антитела в более ранние сроки. РНИФ для исследования парных сывороток следует проводить со специфичными антигенами патогенных риккетсий, циркулирующих в данном очаге. Применение сертифицированной тест-системы для выявления IgM антител к *R. conorii* позволяет верифицировать СКТ на 10-14 день от начала заболевания в 72% (58-88) случаев.

Для видовой идентификации риккетсий в сочетанных очагах риккетсиозов необходимо применение молекулярно-биологических методов исследования, в частности ПЦР с секвенированием по Сэнгеру.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

КПЛ - клещевая пятнистая лихорадка

ПЦР - полимеразная цепная реакция

СКТ – сибирский клещевой тиф