Буйрук Приказ

№ 529 от 19.11.04.г.

Об усовершенствовании эпиднадзора

за сыпным тифом в республике

Заболеваемость сыпным тифом в последние годы в республике носит спорадический характер, обусловленный в основном болезнью Брилла, у лиц, перенесших сыпной тиф в прошлом.

Вместе с тем, наличие поражённости педикулёзом некоторой части населения поддерживает риск передачи инфекции и, в определённой ситуации может осложнить эпидемиологическую обстановку.

В то же время действующие в республике нормативные документы по борьбе с сыпным тифом имеют большую давность времени, не вписываются в деятельность реформированного здравоохранения и, зачастую, не имеют целесообразности с учётом редко возникающих заболеваний.

В целях усовершенствования системы эпиднадзора за сыпным тифом

ПРИКАЗЫВАЮ

1. Утвердить прилагаемые:

1.1 Руководство по эпиднадзору за сыпным тифом;

1.2. Руководство по клинике, диагностике и лечению сыпного тифа;

1.3 Руководство по лабораторной диагностике сыпного тифа;

1. Директорам республиканских клинических центров, больниц, Национального госпиталя, ООБ, ТБ, ЦСМ, главным врачам ЦГСЭН:

2.1 довести настоящий приказ до сведения персонала подведомственных организаций и обеспечить его выполнение в соответствии с утверждёнными руководствами;

2.2. обеспечить постоянное поддержание в рабочем состоянии стационарных дезинфекционных камер.

3. Генеральному директору ДГСЭН (Абдикаримов С. Т.), директору РЦКиООИ (Гайбулин Д.Ш.):

3.1. определить перечень лабораторий, осуществляющих диагностику сыпного тифа и порядок доставки проб;

3.2. обеспечить в необходимом объёме неснижаемый запас диагностических препаратов для серологической диагностики сыпного тифа;

3.3. осуществлять периодическое информирование медицинских работников и населения через информационные бюллетени о видах инсектицидных препаратов против педикулёза, зарегистрированных в республике;

3.4. разработать памятку для населения о мерах дезинсекции при педикулёзе. Срок 1V кв. 2004г.

4. Директору Республиканского центра укрепления здоровья (Айтмурзаева Г.Т.) разработать методическое пособие для учреждений ПМСП по борьбе с педикулёзом. Срок IV кв. 2004г.

5. Начальнику ГУОМПиЛ (Кутукеев Т.С.), руководителю АГСВ (Исакова А.У.), административному директору АБ (Джемуратов К.А.) оказывать поддержку медицинским учреждениям в вопросах борьбы с педикулёзом.

6. Считать утратившим силу приказ Минздрава №320 от 5.03.87. « О дальнейшем усилении и совершенствовании мероприятий по профилактике сыпного тифа».

7. Контроль за выполнением настоящего приказа возложить на заместителя Министра Штейнке Л.В.

МИНИСТР М.М. МАМЫТОВ

Проект вносит ДГСЭН

Генеральный директор С.Т. АБДИКАРИМОВ

Исполнитель: директор РЦКиООИ Д.Ш. ГАЙБУЛИН

тел. 54-45-16

СОГЛАСОВАН:

Первый заместитель министра Т.С.Мейманалиев

Заместитель министра Г.К. ААЛИЕВ

Заместитель министра Л.В.ШТЕЙНКЕ

Руководитель аппарата М.Д. МАДЫБАЕВ

Начальник ГУОМПиЛ Т.С. КУТУКЕЕВ

Начальник УКПиОР Н.С. ИСАКОВ

Юрист А.Э. ШАБДАНАЛИЕВ

Утверждено

приказом Минздрава

Кыргызской Республики

№\_529 от 19.11.04 г.

**Руководство**

# по эпиднадзору за сыпным тифом.

Цель эпиднадзора

Не допущение эпидемического распространения сыпного тифа.

#### Задачи

1. Выявление и учёт больных сыпным тифом и болезнью Брилла.
2. Проведение противоэпидемических мероприятий в очаге сыпного тифа.
3. Организация и проведение мероприятий по борьбе с педикулёзом

# Определение случая сыпного тифа

Клиническое описание

Сыпной тиф (эпидемический сыпной тиф, вшивый) – острое заболевание, вызываемое риккетсиями Провачека, передаваемое вшами и клинически характеризующееся лихорадкой, общей интоксикацией, первичной розеолезно-петехиальной сыпью, расстройствами нервной и сердечно-сосудистой систем.

Лабораторные критерии для диагностики

* Обнаружение антител к риккетсии Провачека с помощью серологических реакций не ранее 8-10 дня в диагностических титрах для РНГА 1:1000, или РСК 1:160, или РА 1:160;
* Выявление в ИФА в остром периоде болезни антител класса JgM к риккетсиям Провачека, или класса JgG, что свидетельствует в пользу болезни Брилла.

Классификация случаев

Вероятный: отвечающий клиническому определению случая с отягощенным эпидемиологическим анамнезом.

Подтвержденный: лабораторно подтвержденный случай.

Регистрации в системе учета инфекционных заболеваний по статистической форме № 1 подлежат подтвержденные случаи.

## I. Выявление, учет и регистрация больных сыпным тифом или болезнью Брилла.

Больные сыпным тифом или болезнью Брилла (далее обе формы заболевания именуются сыпным тифом) выявляются из числа лихорадящих больных при обращении за медицинской помощью (ЦСМ, ГСВ, ФАП, стационары) и среди контактных с больными этой инфекцией.

Больным с лихорадкой неясного генеза (продолжающейся более пяти дней) при подозрении на сыпной тиф, в том числе лихорадящим контактным с больным сыпным тифом назначается двукратное серологическое обследование на сыпной тиф с интервалом 5 -7 дней.

Лихорадящие контактные с больным сыпным тифом подлежат провизорной госпитализации в инфекционное отделение с обязательным серологическим обследованием на сыпной тиф, двукратно с интервалом 5 – 7 дней.

Все лихорадящие больные с клинически установленным диагнозом сыпного тифа подлежат обязательной госпитализации в инфекционные отделения.

Амбулаторные карты, госпитализированных больных с подозрением на сыпной тиф, так же как и оставленных для лечения и обследования на дому больных с лихорадкой неясного генеза, находятся в КИЗ и ПР или у семейного врача до выписки из стационара или завершения лечения в амбулаторных условиях.

Лаборатории, проводящие диагностические исследования на сыпной тиф, при наличии положительных результатов обязаны немедленно информировать ЛПО, направившее материал на исследование и одновременно территориальный центр Госсанэпиднадзора.

О каждом случае заболевания сыпным тифом или подозрении на это заболевание медицинские работники обязаны в день выявления больного сообщить по телефону в территориальный ЦГСЭН, с последующим направлением экстренного письменного извещения (форма № 058у.).

Каждый случай заболевания сыпным тифом или подозрения на него регистрируется в ЛПО по месту выявления в журнале учета экстренных извещений.

При получении экстренного извещения территориальный ЦГСЭН производит регистрацию в журнале учета инфекционных заболеваний по форме № 060у.

Информация о выявленном случае сыпного тифа центрами Госсанэпиднадзора направляется на выше стоящий уровень в порядке внеочередных донесений.

# Эпидемиологическое расследование и мероприятия в очаге

Эпидемический очаг сыпного тифа - это место проживания или временного пребывания больного сыпным тифом в течение 21 дня до начала заболевания (максимального срока инкубации). В эпидемический очаг сыпного тифа включается также место работы, отдыха, лечения, учебы, ДДУ, и др., где мог находиться больной в течение инкубационного периода.

Эпидемиологическое обследование очага сыпного тифа проводится эпидемиологом ЦГСЭН совместно с семейным врачом в течение 24 часов после получения экстренного извещения.

Целью эпидемиологического обследования является определение границ очага, уточнение количества контактных по месту проживания, учебы, работы, определение объема противоэпидемических, дезинфекционных, противопедикулезных мероприятий, а также оформление донесений в ДГСЭН и Республиканский центр карантинных и особо-опасных инфекций.

Для определения границ очага и выявления лиц, общавшихся с больным необходимо тщательно собрать эпидемический анамнез у больного, его родственников, сотрудников и других лиц из окружения больного по месту проживания, работы, учебы или других мест пребывания.

Для определения источника инфекции врач эпидемиолог анализирует медицинскую документацию за время максимального инкубационного периода (21день) предполагаемых источников инфекции среди контактных. При этом обращает особое внимание на лиц, профессионально связанных с риском заражения сыпным тифом (работники транспорта, бань, саун, парикмахерских, санитарных пропускников, химчистки). Устанавливаются места посещения больным за последний 21день, в которых могло произойти заражение, в частности бань, саун, парикмахерских, приобретение поношенной одежды, поездок на поездах дальнего следования, а также уточняется наличие крыс (блох) по месту проживания и близлежащей территории (при эндемическом крысином сыпном тифе).

При эпидобследовании очага Центром госсанэпиднадзора при выявлении педикулеза у больного или среди контактных организуется камерная обработка постельных принадлежностей и личных вещей больного, а также санитарная обработка контактных, пораженных педикулезом.

Лабораторному обследованию на сыпной тиф в очаге подлежат лица из числа вероятных источников инфекции (перенесшие в течение последних 3 месяцев какое-либо заболевание, сопровождающееся лихорадкой), все контактные с педикулезом. Забор крови от возможных источников инфекции организует семейный врач.

Лабораторные исследования проводятся в лабораториях ОЦГСЭН, РЦКиООИ и других лабораториях, определенных в качестве базовых.

Лица с положительными серологическими реакциями на сыпной тиф подлежат обязательной госпитализации для уточнения диагноза. Все данные о результатах эпидемиологического обследования очага заболевания сыпным тифом и проводимых мероприятиях вносятся в эпидкарту, копии эпидкарт направляются в ЦГСЭН, а в конце года в РЦКиООИ.

При подозрении на сыпной тиф или получении серологического подтверждения диагноза сыпной тиф, семейный врач обязан установить наблюдение за очагом в течение 25 дней с еженедельным посещением очага (осмотр на педикулез, опрос, измерение температуры тела).

- лихорадящие из числа контактных должны быть госпитализированы в инфекционную больницу (отделение).

- данные осмотра и наблюдения за контактными заносятся в амбулаторную необходимо произвести запись о закрытии очага. В очаге проводится информационно- образовательная работа с контактными о путях передачи и профилактике сыпного тифа.

III.Организация и проведение мероприятий по борьбе

с педикулезом.

Лечебные учреждения, школы-интернаты, детские дома, дома-престарелых, детские приюты должны иметь специальные укладки, предназначенные для проведения противопедикулезной обработки. Перечень предметов и средств, находящихся в укладке, представлен в приложении.

**Осмотру на педикулез подлежат:**

-учащиеся школ-интернатов, дети, проживающие в детских домах, домах ребёнка, домах престарелых при поступлении и далее по необходимости; осмотр проводит медицинский персонал учреждений с возможным привлечением преподавателей, воспитателей;

-дети, посещающие дошкольные учреждения, при поступлении в ДДУ и далее по необходимости (например, при поступлении сигнала от родителей о появлении педикулеза у ребенка или выявлении при осмотре);

-больные, поступающие на стационарное лечение, осматриваются на приеме медсестрой приемного блока, при выявлении педикулеза больному проводится санобработка в приемном блоке.

В ЦСМ, ГСВ, ФАП, в случае выявления педикулеза при осмотре больного, врач или медсестра дают рекомендации о методах обработки и о противопедикулезных средствах.

При выявлении педикулеза медицинский работник (врач, фельдшер, медсестра) направляет экстренное извещение в территориальный ЦГСЭН (форма 058/у).

Центры Госсанэпиднадзора ведут учет случаев педикулеза с ежемесячным включением их количества в отчетную Ф№1.

По данным учета, эпидемиолог анализирует распространенность педикулеза по территориям, коллективам, группам риска. Информирует общественность через средства массовой информации и другие каналы о распространенности педикулеза и мерах борьбы с ним.

При организации информационно-образовательной работы среди населения по борьбе с педикулёзом могут быть использованы методические рекомендации в приложении к настоящему руководству.

СОДЕРЖИМОЕ УКЛАДКИ, ПРЕДНАЗНАЧЕННОЙ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ

ПРОТИВОПЕДИКУЛЕЗНОЙ ОБРАБОТКИ

(ПРОТИВОПЕДИКУЛЕЗНАЯ УКЛАДКА)

1. Клеенчатый или хлопчатобумажный мешок для сбора вещей

больного.

2. Оцинкованное ведро или лоток для сжигания или

обеззараживания волос.

3. Клеенчатая пелерина.

4. Перчатки резиновые.

5. Ножницы.

6. Частый гребень (желательно металлический).

7. Машинка для стрижки волос.

8. Спиртовка.

9. Косынки (2-3 штуки).

10. Вата.

11. Столовый уксус или 5-10% уксусная кислота.

12. Один или два из препаратов для уничтожения головных вшей, действующих губительно на все стадии вшей (овициды):

- 30% или 50% эмульгирующийся концентрат карбофоса,

- 50% эмульгирующийся концентрат сульфидофоса,

- педилин (эмульсия, шампунь, мазь)

- антибит (эмульсия, шампунь)

- эмульсия бензилбензоата 20%

- лосьоны Лонцид, Нитилон, Перфолон, Ниттифор, пеномоющее средство Талла.

13. Один или два из препаратов для дезинсекции белья из числа овицидов:

- 30% или 50% эмульгирующийся концентрат карбофоса,

- 50% эмульгирующийся концентрат сульфидофоса,

- дусты Сульфолан-У, Бифетрин-П,

- средство Медифокс-Супер.

Для дезинсекции помещений могут применяться 30% или 50% эмульгирующийся концентрат карбофоса или хлорофоса, аэрозольные баллоны Карбозоль, Неофос-2, средство Медифокс-Супер.

Начальник ГУОМПиЛ Генеральный директор ДГСЭН

Т.С. Кутукеев С.Т. Абдикаримов

Утверждено

приказом Минздрава

Кыргызской Республики

№\_529 от 19.11.04 г.

РУКОВОДСТВО

ПО ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО

СЫПНОГО ТИФА И БОЛЕЗНИ БРИЛЛА

1. Введение.

Серологические методы являются обязательным разделом лабораторной диагностики сыпнотифозной инфекции и изучения их эпидемиологии. Серологические реакции выполняются с применением видоспецифических антигенов и вследствие своей высокой специфичности имеют решающее значение для подтверждения риккетсиозной природы заболевания.

Предлагаемые методические рекомендации составлены с целью унификации методик исследований с учетом опыта лабораторий России и в соответствии с рекомендациями Всемирной Организации Здравоохранения.

2. Серологические методы диагностики эпидемического сыпного тифа и болезни Брилла.

2.1. Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА).

Позволяет выявить антитела к возбудителю сыпного тифа, начиная с 5-7-го дня болезни, что придает ей особую ценность. В острый период болезни титры в РНГА колеблются от 1600 до 51200. В основе реакции непрямой гемагглютинации лежит специфическая агглютинация эритроцитов, сенсибилизированных риккетсиозным антигеном или иммуноглобулинами, в присутствии соответствующих групповых антител или антигенов.

2.1.1. РНГА с антигенным риккетсиозным эритроцитарным диагностикумом.

РНГА с антигенным риккетсиальным эритроцитарным диагностикумом предназначена для обнаружения и титрования специфических антител риккетсиальной природы в исследуемых сыворотках людей.

Антигенный эритроцитарный диагностикум представляет собой лиофильно высушенную взвесь 3% формалинизированных эритроцитов барана, сенсибилизированных гидролизованным антигеном (гаптеном) риккетсий.

К антигенному эритроцитарному диагностикуму прилагается лиофильно высушенная 6% взвесь несенсибилизированных (контрольных) формалинизированных эритроцитов барана, предназначенных для контроля исследуемых сывороток и истощения их от неспецифических гемагглютининов. Истощение сывороток может проводиться и неформалинизированными эритроцитами.

Для разведения ингредиентов реакции используют формалинизированный физиологический раствор (ФФР). Последний представляет собой 0,85% раствор хлорида натрия (рН=7.0), к которому добавлен формалин из расчета 0,3мл на 100мл раствора хлорида натрия.

Ингредиенты реакции:

1) Исследуемая сыворотка или исследуемый антиген.

2)Антигенный риккетсиальный или иммуноглобулиновый риккетсиальный эритроцитарный диагностикум или антигены для РНГА.

3) Формалинизированные или негативные эритроциты барана.

4)Физиологический раствор, 1% раствор нормальной кроличьей сыворотки.

5) Формалин.

РНГА можно ставить как макрометодом в стандартных плексигласовых планшетах с лунками, так и микрометодом – в планшетах с лунками типа "U" микротитратора Такачи. При постановке реакции макрометодом эритроцитарный диагностикум и контрольные эритроциты используют в виде 1,5% взвесей. Для приготовления таких взвесей содержимое с эритроцитарным диагностикумом разводят в 2мл, а содержимое ампулы с контрольными эритроцитами – в 4мл ФФР.

При постановке реакции микрометодом антигенный риккетсиальный эритроцитарный диагностикум и контрольные эритроциты используют в виде 0,5% взвесей. Для приготовления таких взвесей содержимое ампулы с эритроцитарным диагностикумом разводят в 6 мл, а с контрольными эритроцитами – в 12мл ФФР.

Исследуемые сыворотки перед постановкой РНГА инактивируют при +56оС в течение 30 минут и истощают эритроцитами барана. С этой целью вскрывают ампулу с эритроцитами, разводят ее содержимое в 4-12мл ФФР (в зависимости от постановки макро - или микрометодом), после чего 5 мл полученной 1% взвеси эритроцитов центрифугируют в течение 5 минут при 2500-3000 об/мин. Надосадочную жидкость отсасывают. К осадку добавляют 1мл исследуемой сыворотки в разведении 1:10, перемешивают, выдерживают 30 минут при +37оС и центрифугируют в течение 5 минут при 2500-3000 об/мин. Надосадочную жидкость, представляющую собой истощенную сыворотку, исследуют в РНГА.

Постановка РНГА.

Вначале готовят исходное разведение исследуемой сыворотки (1:25). С этой целью к 1 мл исследуемой сыворотки в разведении 1:10, истощенной эритроцитами барана, добавляют 1,5 мл ФФР. Для приготовления последовательных разведений исследуемой сыворотки в 10 лунок горизонтального ряда планшета наливают по 0,4 (0,05) мл ФФР. В первую лунку добавляют 0,04 (0,05) мл исходного разведения (1:25) исследуемой сыворотки. После тщательного перемешивания переносят 0,4 (0,05) мл содержимого первой лунки во вторую, из второй переносят в третью 0,4 (0,05) мл и т.д. Из последней лунки 0,4 (0,05) мл смеси выливают. Затем в каждую лунку добавляют, предварительно хорошо размешав, по 0,1(0,025) мл эритроцитарного диагностикума. Планшет встряхивают и оставляют при комнатной температуре. Учет результатов реакции соответственно производят спустя 4-5 или 2-3 часа.

Постановка опыта должна сопровождаться следующими контролями:

1. Контроль исследуемой сыворотки на отсутствие неспецифических гемагглютининов: в лунку планшета наливают 0,2(0,025) мл исследуемой сыворотки в исходном разведении 1:25, добавляют 0,2 (0,025) мл ФФР и 0,1 (0,025) мл контрольных эритроцитов.

2. Контроль эритроцитарного диагностикума на отсутствие спонтанной гемагглютинации: в 2 лунки, содержащие по 0,4 (0,05) мл ФФР, добавляют по 0,1 (0,025) мл эритроцитарного диагностикума.

3. Заведомо положительный контроль: постановка РНГА с тест-сывороткой к риккетсиям Провачека, прилагаемой к данной серии эритроцитарного диагностикума.

Учет результатов РНГА.

Учет результатов реакции проводят по наличию или отсутствию агглютинации эритроцитов. Реакцию считают положительной (оценивают на "+"), если агглютинировавшие эритроциты выстилают дно лунки, образуя по форме перевернутый купол с ровным или фасеточным краем.

Титром исследуемой сыворотки считают максимальное ее разведение, которое вызывает четкую агглютинацию эритроцитарного диагностикума.

Реакцию считают отрицательной (оценивают на "-") при оседании эритроцитов на дно лунки в виде диска или компактного кольца с четким ровным краем. В сомнительных случаях реакцию оценивают на "+-".

2.1.2. РНГА с препаратом на основе нативных эритроцитов

При отсутствии коммерческого антигенного риккетсиального эритроцитарного диагностикума РНГА можно ставить с нативными эритроцитами барана, предварительно сенсибилизированными коммерческим антигеном (гаптеном) риккетсий для реакции гемагглютинации.

Антиген растворяют в физиологическом растворе (рН=7,0) в соответствии с указаниями на этикетке ампулы. 4 мл растворенного антигена смешивают с 0,1 мл осадка отмытых эритроцитов барана, выдерживают смесь в течение 1 часа при +37оС, встряхивая каждые 15 минут, затем центрифугируют 10 минут при 2500-3000 об/мин. Надосадочную жидкость отсасывают, а осадок суспендируют в 10 мл физиологического раствора (рН=7,0), получая 10мл 1% взвеси сенсибилизированных эритроцитов.

Такой препарат может сохраняться в течение нескольких дней при +4оС без снижения активности. РНГА в этом случае ставят на обычном физиологическом растворе (рН=7,0). В остальном подготовка ингредиентов, постановка реакции и учет результатов проводятся точно также, как при использовании сухого антигенного риккетсиального эритроцитарного диагностикума, за исключением первого разведения исследуемой сыворотки, которое берется не 1:25, а 1:250.

2.2. Метод флуоресцирующих антител (МФА).

Метод флуоресцирующих антител - экспресс метод, сочетающий высокую чувствительность люминесцентного анализа с высокой специфичностью иммунологического метода. МФА применяется в лабораторной диагностике с целью выявления риккетсиальных антигенов и антител. Этот метод используют в прямой и непрямой модификации с применением флуоресцирующих конъюгатов, полученных на основе иммуноглобулинов специфических сывороток.

Ингредиенты и оборудование:

1. Риккетсиальные корпускулярные антигены (для МФА).

2. Специфические антириккетсиальные сыворотки.

3. Люминесцирующие специфические риккетсиальные сыворотки.

4.Люминесцирующие антивидовые сыворотки к иммуноглобулинам человека и различного вида животных.

5. Люминесцирующие Fab-фрагменты риккетсиальных антител.

6. Забуференный физиологический раствор рН = 7,2.

7. Спирт 96о.

8. Ацетон.

9. Дистиллированная вода.

10. Бычий альбумин, меченный родамином или Эванс.

11. Люминесцентный микроскоп (МЛ-1, МЛ-2, МЛ-Л, ЛЮМАМ).

12. Предметные стекла.

13. Чашки Петри.

14. Емкости для промывания стекол.

15. Фильтровальная бумага.

2.2.1. Прямой метод флуоресцирующих антител.

Прямой метод флуоресцирующих антител (пМФА) используется с целью выявления риккетсиальных антигенов в биологических пробах и объектах внешней среды.

На тщательно вымытые и обезжиренные предметные стекла делают тонкие мазки или отпечатки исследуемого материала. После высыхания мазки фиксируют этиловым спиртом или ацетоном в течение 30 минут. По мазку восковым карандашом делают ряд окружностей диаметром 0,5 см, в зависимости от количества искомых антигенов, чтобы создать барьер, препятствующий растеканию люминесцирующей сыворотки.

На эти поля фиксированных и высушенных мазков наносят по капле разведенных флуоресцирующих сывороток против искомых антигенов (рабочее разведение указано на ампуле) в смеси с равным объемом Эванса 0,1% или бычьего альбумина, меченного родамином (в смеси оба раствора должны быть в рабочем разведении).

На контрольное поле наносят гетерологичную флуоресцирующую сыворотку так же в смеси с бычьим альбумином. Обработку мазков проводят 30 минут при температуре +37оС во влажной камере (чашка Петри с увлажненным дном), что предупреждает высыхание конъюгата. Отмывание мазков от избытка флуоресцирующей сыворотки производят в фосфатном буферном растворе (рН=7,2-7,4) в течение 10 минут. После ополаскивания дистиллированной водой препараты высушивают на воздухе и исследуют в люминесцентном микроскопе.

Учет результатов реакции.

Препараты исследуют в люминесцентном микроскопе, объектив 90х, окуляр 10х или 7х. Первичные светофильтры для МЛ 2-ФС-1-4; СЗС 7-2; БС-8-2, окулярный или запирающий - 2; для ЛЮМАМ - ФС 1-4; СЗС 21-2, ФС 1-6; окуляр зеленый (т.е. фильтры, которые обычно используют для препаратов, обработанных конъюгатом и изотиоцианата флуоресцеина).

Просматривают не менее 10-20 полей зрения. Оценку результатов пМФА проводят на основании количества, яркости флуоресцеина и морфологических особенностей риккетсий. Для этого используют условную систему обозначения при помощи крестов:

"++++" - яркая, сверкающая флуоресценция;

"+++" - отчетливо выраженная, достаточно яркая флуоресценция с характерным для данного флуорохрома цветом (в данном случае зеленый). Морфология риккетсий выявляется хорошо, у отдельно лежащих корпускул видны четкие колечки (ободки) за счет более яркого свечения комплекса антител с поверхностным антигеном;

"++" - флуоресценция слабая, морфология клеток и цвет люминесценции выявляется достаточно четко;

"+" - флуоресценция очень слабая, морфология риккетсий различима плохо, цвет неопределенный;

"-" - флуоресценция отсутствует.

Результат считается положительным при обнаружении в некоторых полях зрения не менее 5 риккетсий с интенсивностью свечения возбудителя не менее чем на "+++" при четко отрицательном контроле.

2.2.2. Непрямой метод флуоресцирующих антител.

Непрямой метод флуоресцирующих антител (нМФА) или реакция непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ) используют с целью выявления специфических антител у больных и переболевших риккетсиозами людей и животных.

В ампулу с сухим риккетсиальным корпускулярным антигеном за 2 часа до приготовления препарата добавляют 1 мл дистиллированной воды с целью насыщения корпускул риккетсий влагой. Из этого основного разведения готовят рабочее разведение в физиологическом растворе до концентрации, обеспечивающей в каждом поле зрения примерно до 100 риккетсиальных клеток.

На предметное стекло, хорошо вымытое и обезжиренное, наносят капли антигена в соответствующем рабочем разведении. На каждое стекло наносят 8 капель. Этого количества достаточно для испытания одной сыворотки.

Если в вашем распоряжении имеется взвесь антигена, то с ней поступают следующим образом. Из основного раствора готовят рабочее разведение в физиологическом растворе до концентрации, обеспечивающей в каждом поле зрения около 100 риккетсиальных клеток.

На хорошо вымытое и обезжиренное предметное стекло кончиком канцелярского пера или туберкулиновым шприцом со срезанным концом наносят по 8 капель антигена, тщательно перемешанного пипетированием, в соответствующем рабочем разведении.

Мазки хорошо высушивают на воздухе, фиксируют спиртом или ацетоном (приобретенные антигенные пятна уже зафиксированы) в течение 20 минут и сохраняют до использования при температуре от 0 до +4ОС, в пределах месяца. Препараты необходимо оберегать от увлажнения.

Из испытуемых сывороток, предварительно прогретых в течение 30 минут при +56ОС, готовят двукратные разведения в физиологическом растворе (от 1:20 до 1:2560, а при необходимости и выше).

Капли из соответствующих разведений сыворотки наносят на мазки антигена и выдерживают 45 минут во влажной камере при +37оС. Затем препарат промывают фосфатным буфером (рН=7,2-7,4) в течение 10 минут и высушивают на воздухе.

После высушивания на мазки наносят антивидовой (соответствующий испытуемой сыворотке) люминесцирующий гамма-глобулин в рабочем разведении (это разведение указано на этикетке каждой ампулы); мазки вновь выдерживают во влажной камере 30 минут при +370С. В качестве антивидовых препаратов применяют люминесцирующие сыворотки против гамма-глобулина человека и животных в зависимости от видовой принадлежности испытуемых сывороток.

На этом этапе выполнения реакции для гашения неспецифического свечения также рекомендуется использование бычьего альбумина, меченного родамином, или 0,1% раствора Эванса, которые смешиваются с антивидовой люминесцирующей сывороткой в равном объеме, чтобы иметь рабочие дозы указанных ингредиентов. Далее препараты промывают в двух порциях буфера в течение 10 минут и высушивают на воздухе.

В качестве контроля в каждый опыт вводят заведомо положительную

и отрицательную сыворотки и контроль люминесцирующей антивидовой сыворотки: антиген обрабатывают непосредственно антивидовой люминесцирующей сывороткой.

Титром сыворотки считают то наибольшее ее разведение, которое обусловливает свечение риккетсий на "++", при наличии свечения на "+++" или "++++" в предыдущем разведении.

Контроль флуоресцирующей антивидовой сыворотки - свечение риккетсий отсутствует при обработке антигена флуоресцирующей антивидовой сывороткой в рабочем разведении.

2.3. Реакция связывания комплемента (РСК).

Реакция связывания комплемента является универсальной, так как дает возможность получения объективных результатов при проведении текущей и ретроспективной диагностики. Комплементсвязывающие антитела сохраняются в сыворотке переболевших людей десятки лет. В этой связи РСК незаменима для ретроспективной диагностики.

РСК имеет целью определение в исследуемых сыворотках специфических антител.

Сущность реакции заключается в связывании комплемента комплексом антиген-антитело, что обнаруживается в присутствии индикатора: бараньих эритроцитов, сенсибилизированных гемолитической сывороткой. При образовании специфического комплекса антиген-антитело последний связывает комплемент, вследствие чего после добавки гемолитической системы не возникает гемолиза бараньих эритроцитов. Если же комплекс антиген-антитело не образуется, свободный комплемент вызывает гемолиз сенсибилизированных эритроцитов.

Таким образом, положительный результат РСК характеризуется оседанием эритроцитов (задержкой гемолиза), а отрицательный - феноменом гемолиза эритроцитов.

Ниже приведены две схемы постановки РСК.

Ингредиенты реакции: 1) испытуемая сыворотка, 2) антиген;

3) комплемент, 4) гемолитическая сыворотка, 5) эритроциты барана.

Обязательным условием постановки РСК является использование точно оттитрованных компонентов. Реакцию ставят в объеме 0,5 мл (1-я схема) или 0,6 мл (2-я схема).

Для обеспечения точности получаемых результатов необходимо пользоваться отдельной посудой (пробирки, пипетки, колбы), хорошо вымытой и высушенной в суховоздушном шкафу.

Для каждого ингредиента реакции используют отдельную пипетку. Все разведения делают в свежеприготовленном стерильном физиологическом растворе (0,85% раствор химически чистого хлорида натрия в дистиллированной воде).

Исследуемую сыворотку прогревают перед опытом в течение 30 минут при 56-58ОС (для разрушения содержащихся в ней комплемента и ингибиторов).

Риккетсиальные антигены растворяют в указанном на этикетке ампулы количестве физиологического раствора, которое соответствует рабочему разведению, определенному предприятием-изготовителем.

Сухой комплемент разводят согласно прилагаемой к этому препарату инструкции.

Гемолитическая сыворотка выпускается в ампулах: это - сыворотка кролика, иммунизированного по определенной схеме взвесью бараньих эритроцитов. На этикетке ампулы гемолитической сыворотки указан ее титр. В реакции используют разведение гемолитической сыворотки в три раза меньше титра, указанного на этикетке. Например, титр, указанный на этикетке, равен 1:1800; в этом случае в опыт берут сыворотку, разведенную 1:600.

При длительном хранении первоначальный титр гемолитической сыворотки может снижаться. Проверку ее титра производят следующим образом. Готовят основное разведение сыворотки 1:100 (0,1мл гемолитической сыворотки + 9,9 мл физиологического раствора). В ряд пробирок последовательно разливают по 0,1 мл разведений гемолитической сыворотки, начиная с 1:1000 до 1:3600, в каждую пробирку добавляют комплемент в разведении 1:10 в объеме 0,1 мл и по 0,1 мл 3% взвеси бараньих эритроцитов; затем доливают в каждую пробирку по 0,2 мл физиологического раствора. Смесь ингредиентов выдерживают в термостате при +30ОС в течение 1 часа. По наличию полного гемолиза эритроцитов судят о титре сыворотки. Схема титрования гемолитической сыворотки представлена в таблице 1.

Таблица 1

СХЕМА ТИТРОВАНИЯ ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ СЫВОРОТКИ

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Ингредиенты  опыта | Разведение гемолитической сыворотки | | | | | | | | | |
| 1:1000 | 1:1200 | 1:1600 | 1:1800 | 1:2000 | 1:2400 | 1:2800 | 1:3000 | |1:3200 | 1:3600 |
| Гемолитическая сыворотка (мл) | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0.1 | 0,1 | 0,1 | 0.1 | 0.1 |
| 3%взвесьбараньих эритроцитов (мл) | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0.1 | 0,1 | 0,1 | 0.1 | 0.1 |
| Комплемент в раз ведении 1:10 (мл) | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0.1 | 0,1 | 0,1 | 0.1 | 0.1 |
| Физ. раствор (мл) | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 |
| Оценка результатов опыта | - | - | - | - | ++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |

Титр гемолитической сыворотки 1:1800.

Для получения эритроцитов барана кровь, взятую из яремной вены животного, дефибринируют во флаконе с круглыми стеклянными бусами путем встряхивания в течение 10-15 минут, процеживают через стерильную марлю и хранят в холодильнике при температуре от 0 до +4ОС. Перед опытом дефибринированную кровь многократно отмывают при центрифугировании физиологическим раствором (до исчезновения следов гемолиза) и готовят взвесь эритроцитов.

Эритроциты хранят обычно в течение месяца в консерванте "Консервант крови N 7Б", выпускаемом Пензенским заводом медицинских препаратов, или каком-либо другом консерванте.

1-я схема постановки РСК.

Т и т р о в а н и е к о м п л е м е н т а. Постановке основного опыта РСК предшествует титрование комплемента с целью определения его рабочей дозы. Титрование комплемента ведут в присутствии антигена.

Из основного разведения комплемента 1:10 готовят различные дозы в 1 мл (таблица 2).

Таблица 2

СХЕМА ПРИГОТОВЛЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ДОЗ КОМПЛЕМЕНТА

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Ингредиенты реакции | Дозы комплемента | | | | | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| Комплемент в разведении 1:10 (мл) | 0,1 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,5 | 0,6 | 0,7 | 0,8 | 0,9 |
| Физиологический раствор (мл) | 0,9 | 0,8 | 0,7 | 0,6 | 0,5 | 0,4 | 0,3 | 0,2 | 0,1 |

Затем ставят опыт титрования комплемента.

Таблица 3

СХЕМА ТИТРОВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА В ПРИСУТСТВИИ АНТИГЕНА

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Ингредиенты реакции | Дозы комплемента | | | | | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| Комплемент в различных дозах (мл) | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Антиген (мл) | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Физиологический раствор (мл) | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0.1 | 0,1 | 0,1 | 0.1 |
| Гемолитическая система (мл) | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 |
| Оценка результатов | 4+ | 3+ | 2+ | + | - | - | - | - | - |

Оттитрованный комплемент ставят в термостат при +37ОС на 1 час. Через час добавляют гемолитическую систему, состоящую из равных объемов 3% взвеси эритроцитов барана в физиологическом растворе и гемолитической сыворотки в тройном титре (выдержанную предварительно в термостате в течение 30 минут) и через 30 минут производят учет результатов.

Оценка результатов титрования комплемента заключается в определении степени задержки гемолиза: отсутствие гемолиза (полная его задержка) обозначается четырьмя крестами (++++); почти полная задержка (следы гемолиза) обозначается тремя крестами (+++); частичная задержка гемолиза оценивается двумя крестами (++) и, наконец, следы задержки (почти полный гемолиз) - одним крестом (+).

Единицей комплемента считают то наименьшее ее количество, которое вызывает полный гемолиз эритроцитов. В приведенном примере эта единица соответствует 5-й дозе. За полную единицу комплемента принимают вторую пробирку полного гемолиза, в данном примере - 6-я доза. Рабочая доза комплемента равна одной полной единице комплемента при проведении связывания в термостате при +37ОС в течение 1 часа.

П о с т а н о в к а о с н о в н о г о о п ы т а.

1этап. Инактивированные испытуемые сыворотки разводят физиологическим раствором двукратно в пределах 1:10-1:640 и выше в зависимости от срока болезни и разливают по 0,1 мл. К различным разведениям их добавляют по 0,1 мл антигена и комплемента в рабочих дозах.

К каждому опыту ставят следующие контроли:

1) контроль всех испытуемых сывороток (0,1 мл сыворотки в исходном разведении + 0,1 мл физиологического раствора + 0,1мл комплемента в рабочей дозе);

2) контроль антигена (0,1 мл антигена + 0,1мл физиологического раствора, 0,1мл комплемента в рабочей дозе);

3) контроль комплемента (0,1 мл комплемента в рабочей дозе + 0,2мл физиологического раствора);

4) контроль гемолитической системы (0,3мл физиологического раствора);

5) контроль заведомо положительной сыворотки, которую титруют до ее титра;

6) контроль заведомо отрицательной сыворотки, которую титруют в 2-х-3-х разведениях (1:10 - 1:40), включая, так же, как и для п. 5 контроли сывороток в исходных разведениях.

После добавления всех указанных ингредиентов и тщательного встряхивания пробирки ставят в термостат при +37ОС на 1 час.

2 этап. Вынимают пробирки из термостата и добавляют в каждую по 0,2 мл гемолитической системы (предварительно выдержанной в термостате 30 минут). Опять тщательно встряхивают и ставят пробирки в термостат на 20-30 минут в зависимости от гемолиза эритроцитов в контролях.

2-я схема постановки РСК (по Fiset).

Указанная схема отличается от первой общим объемом реакции - 0,6 мл, упрощенным титрованием комплемента, которое проводится при температуре +4ОС 16-18 часов не в день постановки реакции, а 1-2 раза на протяжении месяца при условии работы с одной серией эритроцитов и комплемента сухого или нативного, взятого у морских свинок и хранящегося при температуре не выше -20ОС (однако размороженный комплемент повторному замораживанию не подлежит).

Т и т р о в а н и е к о м п л е м е н т а. Готовят основное разведение комплемента 1:10 (в случае наличия сухого комплемента содержимое ампулы растворяют в 10 мл физиологического раствора), из которого по схеме получают последующие его разведения (обычно до 1:30 - 1:40) (таблица 4).

Таблица 4

СХЕМА РАЗВЕДЕНИЯ КОМПЛЕМЕНТА

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Ингредиенты | Разведения комплемента | | | | | |
| 1:15 | 1:18 | 1:20 | 1:25 | 1:30 | и т.д. |
| Комплемент 1:10 (мл) | 1,0 | 1,0 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |  |
| Физиологический раствор (мл) | 0,5 | 0,8 | 0,5 | 0,75 | 1,0 |  |

Из приготовленных разведений комплемента переносят его по 0,1 мл в контрольный ряд (без антигена) и опытные ряды (по числу использованных в РСК антигенов) (таблица 5).

Таблица 5 ТИТРОВАНИЕ КОМПЛЕМЕНТ

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Ингредиенты реакции | Разведение комплемента | | | | | | |
| Контрольный ряд (оценка качества комплемента) | | | | | | | |
|  | 1:10 | 1:15 | 1:18 | 1:20 | 1:25 | 1:30 | и т.д |
| Комплемент в различных разведениях (мл) | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |  |
| Физиологический раствор (мл) | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |  |
| Гемолитическая система (мл) | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |  |
| Оценка результата | - | - | - | - | - | + |  |
| Опытный ряд (оценка антикомплементарных свойств антигена) | | | | | | | |
| Комплемент в различных разведениях (мл) | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |  |
| Антиген в рабочей дозе (мл) | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |  |
| Физиологический раствор (мл) | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |  |
| Гемолитическая система (мл) <\*> | 0,2 | 0.2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |  |
| Оценка результата | - | - | - | - | + | +++ | ++++ |

<\*> - Добавляют на второй день титрования комплемента (после 16-18 часов экспозиции при температуре + 4ОС)

После 30-минутной экспозиции при температуре +370С учитывают результаты.

Дозу комплемента с антигеном, дающую полный гемолиз, считают за титр комплемента или "полную единицу", в данном примере она соответствует разведению комплемента 1:20. Один раз оттитрованной рабочей дозой комплемента можно пользоваться в течение месяца при работе с этой серией комплемента и эритроцитов.

При постановке реакции "холодным методом" (00С) рабочая доза комплемента соответствует двум полным единицам в виде удвоенного объема комплемента - 0,2 мл. Например, полный гемолиз в опытном ряду, т.е. в присутствии антигена, отмечен в пробирке при разведении комплемента 1:20, а в контрольном ряду - 1:25. В итоге рабочая доза комплемента при использовании в реакции данного антигена соответствует разведению 1:20 в объеме 0,2 мл, поскольку в этих условиях не выявляются антикомплементарные свойства антигена.

Например, на 100 пробирок необходимо приготовить 20мл разведенного 1:20 комплемента (из расчета 0,2 мл на пробирку), следовательно, нужно взять 1,0мл цельного комплемента и 19,0мл физиологического раствора.

Если в реакции используют не 1, а 2 или 3 разного вида антигенов, то и титрование комплемента проводят в присутствии всех видов антигенов, после чего выбирают соответствующие дозы комплемента.

При постановке реакции при +37ОС (горячим методом), рабочая доза комплемента составит 1 полную единицу, т.е. объем его не 0,2, а 0,1 мл и общий объем РСК в этом случае будет 0,5 мл.

В основном опыте контролируют рабочую дозу комплемента, полную единицу комплемента и ее половину ("холодное" связывание) или полную единицу комплемента и ее половину (связывание при +37ОС).

Иными словами, в первом случае: 0,2 мл комплемента в рабочей дозе + 0,2 мл физиологического раствора; 0,1 мл комплемента в рабочей дозе + 0,3 мл физиологического раствора, и 0,05 мл комплемента в рабочей дозе + 0,35 мл физиологического раствора. В 1 и 2-ом контролях должен наблюдаться полный гемолиз, в 3-ем - задержка его на три-два креста. Во 2-м случае (т.е. связывание при +37ёС) для контроля используют 2 последние дозы.

П о с т а н о в к а о с н о в н о г о о п ы т а.

Инактивированные испытуемые сыворотки разводят физиологическим раствором и разливают в пробирки (или лунки полистироловых панелей) по 0,1 мл. К различным разведениям исследуемых сывороток добавляют по 0,1 мл антигена и 0,2 мл комплемента в его рабочей дозе.

Каждый опыт должен сопровождаться следующими контролями:

1. контроль всех испытуемых сывороток (0,1 мл сывороток, в исходном разведении + 0,2 мл комплемента в рабочей дозе + 0,1 мл физиологического раствора);

2. контроль антигена (0,1 мл антигена + 0,2 мл комплемента в рабочей дозе + 0,1 мл физиологического раствора);

3. контроль комплемента (как указано выше);

4. контроль гемолитической системы (0,4 мл физиологического раствора).

Кроме того, необходимо в качестве контроля вводить в опыт заведомо положительную и отрицательную сыворотки с их контролями. Положительную сыворотку разводят до ее титра. После тщательного встряхивания пробирки ставят в холодильник при 0ОС на 16-20 часов (1-й этап реакции, таблица 6).

Таблица 6

СХЕМА ПОСТАНОВКИ ОСНОВНОГО ОПЫТА РСК

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Ингредиенты реакции | Разведение сывороток | | | | | | | Конт роль сыворотки | Конт роль анти- гена | Конт роль ком- племента | Конт роль гем- системы |
| 1:10 | 1:20 | 1:40 | 1:80 | 1:160 | 1:320 | 1:640 |
| 1-й этап | | | | | | | | | | | |
| Сыворотка (мл) | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | - | - | - |
| Антиген (мл) | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | - | 0,1 | - | - |
| Комплемент (мл) | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | - | - |
| Физ.раствор (мл) | - | - | - | - | - | - | - | 0,1 | 0,1 | - | 0,2 |
| Экспозиция 16-20 часов при + 4оС | | | | | | | | | | | |
| 2-й этап | | | | | | | | | | | |
| Гемолитическая система (мл) | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0.2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0.2 | 0.2 |
| Физ.раствор (мл) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,4 |
| Экспозиция 20-30 минут при + 37ОС | | | | | | | | | | | |

На втором этапе в каждую пробирку или лунку панелей добавляют по 0,2 мл гемолитической системы, предварительно выдержанной в термостате при + 37ОС 30 минут. Пробирки или панели тщательно встряхивают и ставят в термостат на 20-30 минут в зависимости от гемолиза эритроцитов в контролях. В пробирках с заведомо положительной сывороткой и в контроле гемолитической системы должна наблюдаться задержка гемолиза.

Оценка главного опыта заключается в степени задержки гемолиза в пробирках с испытуемыми сыворотками по сравнению с соответствующими контролями, в которых возник полный гемолиз. Титром сыворотки считают наибольшее ее разведение, характеризующееся задержкой гемолиза не менее чем на три креста. Диагностическим титром может считаться 1:10 при условии нарастания титра в 4 раза (и более) в парных сыворотках с интервалом в 7 дней.

Результаты реакции считают достоверными, если в контролях испытуемых сывороток, в контроле антигена и рабочей дозе комплемента имеется полный гемолиз, а в контроле гемолитической системы гемолиз отсутствует.

В РСК оба ингредиента используются в дозе, равной 1 ЕД. Дозы определяют путем перекрестного ("шахматного") титрования.

2.4. Реакция агглютинации с риккетсиями Провачека (РА).

Реакция агглютинации является наиболее простым тестом и может быть применена для лабораторной диагностики не только сыпного тифа, но и большинства риккетсиозов. Вместе с тем для ее постановки необходимы дорогостоящие тщательно очищенные корпускулярные риккетсиальные антигены.

Ее преимуществом является минимальное число компонентов реакции (исследуемая сыворотка и антигенный диагностикум) и более раннее выявление агглютининов.

Метод обладает, вместе с тем, существенными недостатками:

1) для исследований пригодны только свежие негемолизированные сыворотки, хранящиеся не более 14 дней;

2) затруднена ретроспективная диагностика, поскольку агглютинины выявляются менее продолжительное время после болезни;

3) в случае использования бесцветного антигена - субъективизм

при оценке результатов.

Ингредиенты реакции: 1) исследуемая инактивированная при +56ОС в течение 30 минут сыворотка, 2)корпускулярный антиген, 3) физиологический раствор.

РА выполняется в макро- (0,4 мл; 6 капель - по Мосингу) и микровариантах (0,05 мл) всегда объемным способом, что ведет к

разбавлению вдвое начального разведения сыворотки (например, сыворотка, разведенная 1:10 в объеме 3 капель, при добавлении антигена в объеме 3-х капель будет иметь разведение 1:20).

Для микроварианта РА используют бесцветные корпускулярные антигены, которые разводят согласно этикетке на ампуле, и жидкий антиген коричневого цвета, приготовленный из риккетсий Провачека, культивируемых в кишечнике вшей (для РА может быть использован также сухой люминесцирующий диагностикум из риккетсий для ИФРМА).

Постановка РА. Макровариант.

Готовят в агглютинационных пробирках или пластинах последовательные двукратные разведения исследуемой сыворотки с 1:5 в объеме 0,2 мл или 3-х капель. С этой целью вносят во все пробирки, кроме первой, по 0,2 мл физиологического раствора (или по 3 капли). В отдельной пробирке или лунке готовят исходное разведение сыворотки (1:5), т.е. 0,1 мл сыворотки + 0,4 мл физиологического раствора. Из него 0,2 мл (3 капли) вносят в первую пробирку или лунку, 0,2 мл (3 капли) - во вторую и 0,2 мл (3 капли) – в контрольную. Из 2-й пробирки после перемешивания сыворотки и физиологического раствора 0,2 мл (3капли) переносят в следующую и так до конечного разведения. Первое разведение сыворотки (1:5) после добавления антигена будет соответствовать 1:10, о чем делается надпись на пробирке или лунке.

После окончания разведения всех сывороток во все разведения сывороток добавляют антиген (за исключением контроля сыворотки) по 0,2 мл (3 капли), встряхивают штативы с пробирками или панели (продувая воздух в пластины из пипетки) и оставляют на 16-18 часов при +37ОС (пластины покрывают стеклом во избежание подсыхания ингредиентов).

Постановка РА предусматривает контроль каждой исследуемой сыворотки: 0,2 мл (3 капли) начального ее разведения + 0,2 мл (3 капли) растворителя; контроль антигена: 0,2 мл (3 капли) антигена +0,2 мл(3 капли) растворителя, а также ставят контроль стандартной специфической сыворотки с известным титром антител. Последнюю разводят на одно разведение выше указанного на этикетке титра (табл.7)

Таблица 7

СХЕМА ПОСТАНОВКИ РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Ингредиенты | Разведения исследуемой сыворотки | | | | | | | Контр. сыво-  ротки | Контр. анти-  гена |
| 1:10 | 1:20 | 1:40 | 1:80 | 1:160 | 1:320 | 1:640 |
| Сыворотка(мл) | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | - |
| Антиген (мл) | 0,2 | 0,2 | 0,.2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | - | 0,2 |
| Физ.раствор(мл) | - | - | - | - | - | - | - | 0,2 | 0,2 |

После термостата штативы выдерживают два часа при комнатной температуре, не встряхивая пробирки, поскольку образуемый агглютинат имеет вид нежного перевернутого зонтика и очень легко разрушается.

У ч е т р е з у л ь т а т о в.

Результаты реакции учитываются невооруженным глазом или с помощью агглютиноскопа по 4-х крестной системе:

- полное просветление жидкости над осадком, имеющим вид перевернутого зонтика - четыре креста (++++);

- неполное просветление жидкости над таким же осадком – три креста (+++);

- мутная жидкость при наличии небольшого зернистого осадка на дне и стенках пробирки - два креста (++);

- мутная жидкость, возможен осадок в виде точки - один крест (+).

Реакция считается положительной при наличии интенсивности агглютинации риккетсий на три креста в конечном разведении; в контролях сывороток и антигена не должно быть агглютинации, а титр стандартной сыворотки должен соответствовать указанному на этикетке (допускается изменение титра на одно разведение).

2.5. Определение специфических антител к риккетсиям Провачека иммуноферментным методом (ИФА).

Принцип иммуноферментного анализа основан на образовании иммунного комплекса специфических антител с антигеном, иммобилизированном на полистироловом планшете, с последующим его выявлением антивидовым коньюгатом, меченым ферментом.

Ферментативная активность пропорциональна содержанию специфических антител в сыворотке и проявляется при помощи субстратов для данного фермента.

Иммуноферментный метод обладает рядом существенных преимуществ перед традиционными иммунологическими реакциями, главным из которых является высокая чувствительность, специфичность, возможность получения количественных данных, воспроизводимость, стандартизация основных ингредиентов анализа, исследование сильно загрязненных образцов, возможность автоматизации всех этапов постановки.

Метод ИФА применяют для серодиагностики эпидемического сыпного тифа и болезни Брилла, как наиболее чувствительный и позволяющий выявить инфекцию независимо от ее клинической выраженности.

Ингредиенты, необходимые для постановки ИФА:

1. Коммерческие цельнорастворимые антигены р. Провачека для РСК.

2. Положительная сыпнотифозная контрольная сыворотка

человека (К+).

3. Сыворотки людей, не содержащие антигены к риккетсиям

Провачека (К-).

4. Буфер адсорбции или присоединения, рН 9,5-9,7

5. Буфер инкубации или разведения, рН 7,2-7,4

6. Буфер промывки, рН 7,2-7,4

7. Субстрат-индикаторный раствор, рН 5,5-6,0

8.Антивидовой конъюгат - антитела диагностические против иммуноглобулинов человека, меченые пероксидазой, сухие (производство НИИЭМ им. Гамалеи РАМН)

9. Серная кислота (Н2SО4).

Оборудование:

1. Пипетки стеклянные на 1 мл, 2 мл, 5 мл, 10 мл.

2. Микропипетки стеклянные на 0,1 мл, 0,2 мл.

3. Автоматические пипетки Р-20 (на 20 мкл), Р-200 (на 200

мкл), Р-1000 (на 1000 мкл).

4. Химические колбы и пробирки.

5. Бутылки на 3 л и 5 л.

6. Весы технические с разновесами.

7. Весы торзионные или аналитические с разновесами.

8. рНметр.

9. Резиновые груши.

10. Планшеты для иммунологических реакций однократного

применения.

11. Холодильник бытовой.

12. Бумага фильтровальная.

13. Термостат.

14. Фотометр.

Реактивы:

1. Карбонат натрия (Na2CO3)

2. Бикарбонат натрия (NaНCO3)

3. Натрий фосфорнокислый однозамещенный (NaН2РO4х2Н2О).

4. Натрий фосфорнокислый двузамещенный (NaНРO4х12Н2О).

5. Хлористый натрий (NaCl).

6. Твин 20.

7. Лимонная кислота.

8. 3% раствор перекиси водорода (Н2О2).

9. Орто-фенилендиамин (ОФД).

10. 1н раствор серной кислоты (Н2SО4).

11. Вода дистиллированная.

П о д г о т о в к а и н г р е д и е н т о в р е а к ц и и.

Антиген разводят в 0,05М карбонат-бикарбонатном буфере, рН 9,5-9,7 (буфер присоединения) в раститровке. Рабочее разведение подбирают "шахматным" титрованием антигена, антител (положительного и отрицательного контроля) и конъюгата.

Для каждой новой серии антивидового конъюгата, антигена или при смене полистероловых планшетов одной фирмы на другую необходимо снова опытным путем ("шахматное" титрование) подобрать оптимальные разведения антигена и конъюгата, которые станут рабочими. Сыворотки разводят в 0,02М фосфатно-солевом буфере, рН 7,2-7,4 содержащем, 0,1% детергента (твин 20) для уменьшения неспецифической реакции (буфер инкубации). В качестве буфера промывки используют буфер инкубации.

Антивидовой конъюгат разводят в 0,02М фосфатно-солевом буфере, содержащем 0,1% твин 20 и 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА) для уменьшения неспецифической сорбции конъюгата на полистирол, сенсибилизированный антигеном. Необходимо помнить, что при разведении конъюгата перемешивать раствор надо осторожно, не вспенивая его, так как это приведет к денатурации фермента.

Субстрат для пероксидазы (ОФД) разводят в 0,1М цитратно-фосфатном буфере рН 5.5-6,0 незадолго до использования (не более чем за 30-60 минут до использования).

Все буферные растворы готовят заранее и хранят при температуре +4ОС. Буфер с твином не хранится на холоде и используется в тот же день при комнатной температуре. Исходный раствор коммерческого цельнорастворимого антигена в стерильном физиологическом растворе хранят около месяца при температуре +4ОС.

К исходному раствору коммерческого конъюгата (антитела диагностические против иммуноглобулинов человека, меченые пероксидазой) добавляют равный объем стерильного глицерина, в качестве антифриза и хранят на холоде -100С до срока годности, указанного на ампуле.

Пероксидаза отличается способностью активировать перекись водорода таким образом, чтобы она в присутствии окисляющихся веществ (ОФД) отдала им один атом кислорода. В отсутствие окисляющихся веществ, пероксидаза не разлагает перекись водорода.

Поэтому активность пероксидазы определяют в среде, содержащей 0,04% ОФД и 0,04% перекиси водорода в 0,1М цитратно-фосфатном буфере рН 5,5-6,0, инкубируя в течение 30 минут, реакцию останавливают добавлением равного объема 1Н серной кислоты, определяя оптическую плотность при 492нм на фотометре.

Готовят субстрат-индикаторный раствор непосредственно перед внесением на планшет. В раствор ОФД в 0,1М цитратно-фосфатном буфер рН 5,5-6,0 добавляют свежеприготовленную из пергидроли (33%-50%) 3% перекись водорода, перемешивают и быстро разливают в лунки планшета. После этого планшет помещают в темное место или тщательно прикрывают, оставляя инкубироваться при комнатной температуре. Оставшийся субстрат-индикаторный раствор должен оставаться бесцветным в течение 30 минут при комнатной температуре. Если раствор субстрата начинает менять окраску в желтый цвет различных оттенков (от светло-желтого до коричнево-оранжевого), это говорит об окислении ОФД разлагающейся перекисью водорода под воздействием шероховатой, плохо промытой от щелочи стеклянной посуды. Необходимо отметить, что при длительном хранении перекиси водорода в стеклянной емкости происходит ее медленное разложение под влиянием следов щелочи, которые попадают в раствор вследствие растворения стекла. Чистые, без всяких добавок, растворы перекиси водорода сохраняют в парафинированных сосудах при комнатной температуре, в этих условиях скорость разложения перекиси водорода равна нулю.

П о с т а н о в к а р е а к ц и и.

В лунки планшета вносят коммерческий антиген в раститровке или в рабочем разведении по 0,1 мл (100 мкл).

Планшеты закрывают крышкой и оставляют на 16-18 часов при +4ОС (это можно сделать за день до всего объема работы) или помещают в термостат при +37ОС на 2 часа для сенсибилизации лунок планшета антигеном.

Содержимое лунок интенсивно встряхивают, а лунки заливают до верха буфером промывки, содержащим 0,1% твин-20. Инкубируют 5 минут при комнатной температуре, встряхивают, подсушивают, интенсивно постучав о фильтровальную бумагу, и вновь повторяют процедуру промывки (3 раза).

После последней промывки планшет тщательно высушивают, интенсивно постукивая о фильтровальную бумагу (или чистое полотенце), так чтобы на дне лунок не оставалось влаги.

Вносят двукратное разведение сывороток, начиная с диагностического титра 1:500 по 0,05 мл (50 мкл). Желательно работать с параллелями, внося одно разведение не менее чем в две лунки.

Планшет закрывают крышкой и помещают в термостат (+37ОС) на 1 час. В течение этого времени происходит образование иммунного комплекса антиген-антитело.

Содержимое лунок встряхивают и промывают, как указано в п. 5.3.

Вносят антивидовой конъюгат (антитела диагностические против иммуноглобулинов человека, меченые пероксидазой) в рабочем разведении или в раститровке в лунки планшета по 0,05мл (50 мкл). Конъюгат разводят в буфере инкубации, содержащем 0,1% твин-20 и 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА) для уменьшения неспецифической сорбции конъюгата на иммунный комплекс антиген-антитело.

Планшет закрывают крышкой и помещают в термостат (+37ОС) на 30 минут. При этом происходит специфическое присоединение трех молекул антивидового конъюгата к Fc фрагменту антитела в иммунном комплексе антиген-антитело.

Содержимое лунок встряхивают, промывают 3-4раза дистиллированной водой, заливая лунки до верха и сразу встряхивая без инкубации, а затем провести процедуру промывки как в п.5.3, желательно 3-4 раза по 5 минут.

Во все лунки тщательно высушенного планшета вносят субстрат-индикаторный раствор по 0,05 (50 мкл).

Планшет оставляют в темноте при комнатной температуре в течение 20-30 минут. За это время происходит окисление ОФД перекисью водорода, катализируемое ферментом (пероксидазой), и окраска содержимого лунок меняется от бесцветного до желтовато-коричневой, темно-коричневой различной интенсивности (в зависимости от концентрации фермента в присоединившемся конъюгате к комплексу антиген-антитело).

Реакцию останавливают внесением 0,05 мл (50 мкл) 1Н серной кислоты. Оценивать реакцию можно как визуально, так и инструментально на фотометре при длине волны 492 нм.

Контроли:

"Негативный" контроль - сыворотка людей, содержащая неспецифические антитела, (заведомо отрицательная), в диагностическом титре 1:500.

"Позитивный" контроль - сыворотка людей, содержащая специфические антитела (заведомо положительная), в раститровке начиная с диагностического титра 1:500.

Контроль субстрата - субстрат-индикаторный раствор без антигена, сыворотки и антивидового конъюгата.

На каждый из контролей отводят две лунки. Необходимо ставить все контроли на каждом планшете любого опыта.

У ч е т р е з у л ь т а т о в р е а к ц и и.

Реакцию учитывают в том случае, если интенсивность окрашивания "позитивного" контроля превышает не менее чем вдвое окраску "негативного" контроля в том же разведении. Также оценивают и испытуемые сыворотки, сравнивая их окрашивание с окрашиванием "негативного" контроля в диагностическом титре 1:500. За титр испытуемой сыворотки принимают последнее наибольшее разведение сыворотки, превышающее в 2 раза интенсивность "негативного" контроля.

Обычно положительная проба имеет на глаз желто-коричневую окраску различной интенсивности в отличие от бесцветной или слегка желтоватой "негативного" контроля. Реакцию можно оценивать как визуально, так и инструментально на фотометре при длине волны 492 нм. Результаты выражают в единицах оптической плотности (ОП), за положительный результат принимают то разведение нетитруемой сыворотки, которое дает превышение оптической плотности "негативного" контроля в диагностическом титре 1:500 в 2 и более раз.

Для сывороток больных с диагнозом "болезнь Брилла" обычно характерны титры 1:64000-1:256000, тогда как титры людей, выявленных ретроспективно - 1:500-1:64000.

Состав буферов и растворов.

1. Буфер адсорбции или присоединения (покрывающий буфер) 0,02М карбонат-бикарбонатный буфер (КББ) рН 9,5-9,7

Na2CО3 - 1,18 г

NaHCO3 - 3,47 г

Разбавить дистиллированной водой до 1000 мл.

2. 0,02М фосфатно-солевой буфер (ФСБ), рН 7,2-7,4

Na2НРО4х12Н2О - 17,9 г

NaН2РО4х2Н2О - 0,78 г

NaCl - 42,5 г

Разбавить дистиллированной водой до 5000 мл.

3. Буфер инкубации или разведенная, рН7,2-7,4

а) 0,02М ФСБ б) 0,02М ФСБ

твин-20 - 0,01% твин-20 - 0,01% + 1% БСА

4. Буфер отмывки, рН 7,2-7,5

0,02 ФСБ

твин-20 - 0,01%

5. 0,1М цитратно-фосфатный буфер (ЦФБ), рН5,5-6,0

6,4 мл 0,2М Na2НРО4х12Н2О (17,9 г на 250 мл дист. воды)

6,1 мл 0,1М лимонной кислоты (5,255 г на 250 мл дист. воды)

12,5 мл дистиллированной воды.

6. Субстрат-индикаторный раствор

25,0 мл 0,1М ЦФБ

9-10 мг орто-фенилендиамина

0,35 мл 3% перекиси водорода

7. 1Н раствор серной кислоты (Н2SО4). Готовят из концентрированной серной кислоты 16Н Н2SО4 - 10 мл концентрированной Н2SО4 растворить в 150 мл дистиллированной воды.

П р и г о т о в л е н и е р а с т в о р о в.

Приготовление забуференного физиологического раствора.

В 1 л физиологического раствора (0,87% раствор хлористого натрия) растворить 1,513 г фосфорнокислого двузамещенного натрия и 0,204 г фосфорнокислого однозамещенного калия. рН забуференного физиологического раствора должен быть 7,4-7,5.

Приготовление вероналового буфера.

В мерный литровый флакон добавляют 200 мл буфера, затем наполняют флакон до литровой отметки раствором желатины и тщательно перемешивают. Измеряют рН.

Приготовление раствора буфера.

В 2-х литровый флакон добавляют 1,5 л дистиллированной воды, 83,0 г NаCl, 10,19 г Nа-5,5-диэтилбарбитурата. Перемешивают до полного растворения. Добавляют 34,58 мл 1 М НCl и перемешивают, 5,0 мл раствора МgCl2 CaCl2.

Затем добавляют дистиллированную воду до отметки 2 литра и перемешивают. Готовят разведения буфера 1:5 и измеряют рН.

Приготовление раствора МgCl2 CaCl2.

В 250 мл флакон наливают 100 мл дистиллированной воды. Добавляют: 20,3 г МgCl2 и 4,4 г CaCl2. Перемешивают.

Приготовление водного раствора желатины.

В сосуд емкостью 1 л наливают 100 мл дистиллированной воды и добавляют 1 г желатины. Кипятят. Охлаждают при комнатной температуре и добавляют 700 мл дистиллированной воды (срок хранения - 1 неделя).

Приготовление формалинизированного физиологического раствора.

В 1л физиологического раствора добавить 3 мл 40% формальдегида.

К о н с е р в а н т ы.

Консервант для комплемента.

Жидкий комплемент хранят при температуре 20ОС либо консервируют химическими смесями: 0,05 г сернокислого натрия и 0,04 г кристаллической борной кислоты на 1 мл сыворотки (Гинзбург, Калинина, 1947).

Консерванты для эритроцитов.

1) Консервант крови N 7Б. Выпускается Саранским заводом медицинских препаратов в стерильных стеклянных флаконах емкостью 250 мл. Консерванта во флаконе 50 мл. Консервирование эритроцитов проводят путем непосредственного соединения взятой от барана крови с консервантом.

2) Раствор "Глюгицир". Представляет собой глюкозо-цитратный раствор N 7б без левомицетина. Выпускается Пензенским заводом медицинских препаратов в стеклянных флаконах. Консерванта во

флаконе - 75 мл.

Взятие и обработка крови для серологических реакций.

Для серологических реакций предпочтительнее брать кровь из пальца. Кожу пальца (предпочтительно 4-го левой руки) протирают спиртом или эфиром и слегка подсушивают. Иглой или пером для оспопрививания наносят резкий укол в мякоть пальца, появившуюся первую каплю крови удаляют тампоном, а затем легким, ритмичным сжатием пальца с боковых поверхностей выдавливают несколько капель крови. Кровь набирают градуированной пипеткой (1 мл или 2 мл) и переносят в приготовленную стерильную пробирку, которую рекомендуется держать наклонно для получения скошенной поверхности крови. Необходимый объем крови 1-1,5 мл.

Пробирки с кровью помещают в термостат для образования сгустка. Образовавшийся кровяной сгусток отделяют от стенок пробирки пастеровской пипеткой или тонкой прокаленной и остуженной проволокой, бактериологической петлей или осторожным поколачиванием пробирки о ладонь. Пробирки с кровью помещают в рефрижератор или прохладное место для образования и отстаивания сыворотки.

На следующий день на кровяном сгустке образуется прозрачная, желтоватого цвета сыворотка, которую отделяют от сгустка в стерильную пробирку. Сыворотка не должна содержать эритроциты.

При условии срочного получения сыворотки последняя отделяется от сгустка спустя 1-2 часа после его образования с помощью центрифугирования.

На пробирке с кровью должен быть указан или регистрационный номер больного, включающий сведения из журнала о его фамилии, имени, возрасте, дате взятия крови, дне болезни и диагнозе, или перечисленные сведения пишутся на этикетке, наклеенной на пробирку с кровью.

В случае, когда предполагается осложнение в получении нужного количества крови (1 мл), например, у детей, кровь забирают в пробирки, содержащие стерильный физиологический раствор с 0,25% лимоннокислым натрием (99,75 мл физиологического раствора + 0,25 мл лимоннокислого натрия).

В этом случае объем взятой крови может быть сокращен до 0,4 мл. В пробирки предварительно набирают 1,8 мл раствора, препятствующего свертыванию крови, вносят 0,4 мл.

Хранение и транспортировка сывороток.

Разрушение сывороточных белков происходит в результате тепловой их денатурации, протеолиза или при изменении рН растворов. Полное сохранение свойств сывороток (имеются в виду иммунные глобулины) обеспечивается при содержании их в замороженном (-70ОС) или высушенном (под вакуумом) состоянии.

Риккетсиальные сыворотки, подлежащие исследованию на протяжении 7-14 дней, рекомендуется хранить при +4ОС в ампулах, под резиновыми пробками в пробирках (можно ватными, но пропитанными парафином) во избежание высыхания сывороток. На более длительные сроки хранения сыворотки рекомендуется замораживать при -20ОС (рекомендация научной группы ВОЗ), если отсутствуют условия для создания более низких температур (-70О  или -196ОС). Размораживают сыворотки при +37ОС.

Проверенным способом хранения риккетсиальных сывороток является их лиофильное высушивание. По имеющимся наблюдениям в лиофилизированных сыворотках уровни титров антител не изменяются на протяжении до 15 лет хранения при +4ОС.

Высушенные на бумаге сыворотки пригодны для серодиагностики (в РСК) сыпного тифа, крысиного сыпного тифа, лихорадки Ку и риккетсиозов клещевой группы на протяжении до полутора месяцев их хранения при +18-37ОС.

Транспортировку сывороток, высушенных на бумаге, осуществляют в двойных конвертах. Жидкие сыворотки в ампулах или лиофилизированные для пересылки упаковывают в бумажные салфетки или вату и помещают в герметичные контейнеры. Наилучший метод транспортировки жидких сывороток - в сосудах (термосах с сухим льдом или контейнерах с жидким азотом) автотранспортом. Доставку сывороток в лабораторию осуществляют нарочным.

Генеральный директор ДГСЭН С.Т. Абдикаримов

Утверждено

приказом Минздрава

Кыргызской Республики

№\_529 от 19.11.04 г.

#### Руководство

**По клинике, диагностике и лечению эпидемического сыпного тифа, болезни Брилла и эндемического сыпного тифа**

# Определение случая сыпного тифа

Клиническое описание

Сыпной тиф (эпидемический сыпной тиф, вшивый) – острое заболевание, вызываемое риккетсиями Провачека, передаваемое вшами и клинически характеризующееся лихорадкой, общей интоксикацией, первичной розеолезно-петехиальной сыпью, расстройствами нервной и сердечно-сосудистой систем.

Лабораторные критерии для диагностики

* Обнаружение антител к риккетсии Провачека с помощью серологических реакций не ранее 8-10 дня в диагностических титрах для РНГА 1:1000, или РСК 1:160, или РА 1:160;
* Выявление в ИФА в остром периоде болезни антител класса JgM к риккетсиям Провачека, или класса JgG, что свидетельствует в пользу болезни Брилла.

Классификация случаев

Вероятный: отвечающий клиническому определению случая с отягощенным эпидемиологическим анамнезом.

Подтвержденный: лабораторно подтвержденный случай.

Регистрации в системе учета инфекционных заболеваний по статистической форме № 1 подлежат подтвержденные случаи.

**Сыпной тиф** – острое заболевание, вызываемое риккетсиями Провачека, передаваемое вшами и клинически характеризующееся циклическим течением с лихорадкой, тифозным состоянием, кожными высыпаниями, расстройствами нервной и сердечно-сосудистой систем. Различают и регистрируют две формы сыпного тифа – эпидемическую и рецидивную (болезнь Брилла).

Этиология:

Возбудитель Rickettsia prowazekii - мелкий (0,2 - 0,3Х 0,2 - 1,0 мкм), неподвижный, не образующий спор и капсул полиморфный микроорганизм, грамотрицательный, окрашивается по Романовскому - Гимзе, методом П.Ф. Здродовского и серебрением по Морозову. Обладает гемолизинами и эндотоксинами, имеет соматический термостабильный, сходный с таковым у Риккетсий Музера, антиген и термолабильный видоспецифический антиген, отличающий от антигенов Р. Музера и др. риккетсий. В организме человека паразитирует в цитоплазме эндотелиальных и мезотелиальных клеток. Культивируется в легких мышей, на куриных эмбрионах и тканевых культурах. Риккетсии Провачека чувствительны к нагреванию и действию дезинфицирующих веществ в обычных концентрациях, но устойчивы к действию низких температур и высушиванию, длительно сохраняются в высушенных фекалиях вшей, чувствительны к антибиотикам(тетрациклин, левомецитин, эритромицин, рифампицин).

Патогенез

Попавшие в кровь риккетсии Провачека быстро проникают в клетки эндотелия сосудов, в которых они размножаются и при гибели выделяют эндотоксин. В результате эндотелиальные клетки набухают, происходит их десквамация и разрушение.

Размножение риккетсий происходит в инкубационной периоде и в первые 1-2 дня лихорадочного периода, позже оно постепенно замедляется, но всё же их можно обнаружить в органах и тканях в течение всего лихорадочного периода и в первые 3-5 дней нормальной температуры.

Элементарной формой поражения сосудов при сыпном тифе является бородавчатый эндоваскулит – ограниченная деструкция эндотелиального покрова и отдельных эндотелиальных клеток на месте внедрения риккетсий с образованием пристеночного коагуляционного тромба в виде круглой или конусовидной бородавки с последующим развитием вокруг сосуда эксцентрично лежащего инфильтрата (муфта). Такой процесс характеризуется как периваскулит.

Распространение изменений на всю толщу сосудистой стенки с сегментарным или круговым некрозом ведет к полной обтурации сосуда тромбом, что определяется как деструктивный тромбоваскулит. Вокруг участка повреждения сосудов, в особенности капилляров, прекапилляров, артериол, венул микроскопически отмечаются скопления полиморфиоядерных клеточных элементов и макрофагов – специфические сыпнотифозные гранулёмы или узелки Попова-Давыдовского. Последние выявляются с 6-8 дня болезни во всех органах и тканях, но больше всего – в головном мозге, коже, конъюнктивитах, надпочечниках, миокарде, селезенке и почках. Постоянство и тотальность этих изменений в головном мозге позволяет говорить о «сыпнотифозном менингоэнцефалите». Сыпнотифозный гранулёматоз в сочетании с постоянным сосудорасширяющим действием риккетсиозного токсина (эндотоксина) вызывает значительные нарушения в центральной нервной системе и расстройства кровообращения.

Патологическая анатомия

Отмечается некоторая отечность мозговых оболочек, часты набухания вещества мозга, кровоизлияния в вещество его. Сердце несколько дрябловатое. В надпочечниках выявляются отек коркового слоя и капсулы, кровоизлияния в коре. В 2-4 раза увеличивается селезенка, но она не дряблая, в ткани её выражена гиперемия. Нередки пневмонии. Гистологически выявляется картина специфических узелковых изменений в сосудах, о чем сказано выше. Обратное развитие их начинается с 18-20 дня от начала болезни и заканчивается к концу четвертой недели, а иногда и позже. После перенесённой болезни создаётся длительный, но не всегда стойкий иммунитет.

Клиника

Инкубационный период длится 6-22 дня (в среднем 12-14 дней).

В течение болезни различают три периода:

1. начальный – первые 4-5 дней болезни – от повышения температуры до высыпания характерной сыпи;
2. период разгара – 4-8 дней – от момента появления сыпи до окончания лихорадочного состояния;
3. период выздоровления – от начала падения температуры до полного исчезновения всех клинических признаков болезни.

Болезнь обычно начинается остро: с чувства жара, иногда с лёгким познабливанием, слабости, головной боли, бессонницы, потери аппетита, повышения температуры. Эти явления прогрессируют в течение первых 2-3 дней. В первые дни головная боль почти всегда сильная, бессонница стойкая, раздражительность и беспокойство, переходящее в состояние эйфории. Вместо эйфории иногда наблюдается состояние заторможенности. Может быть повторная рвота. Объективно выявляются выраженная гиперемия лица, конъюнктив, кожи шеи и верхней части туловища, легкая анемия, одутловатость лица, умеренный цианоз губ. Кожа на ощупь горячая, положителен симптом щипка. Возможны герпетические высыпания на губах и на коже носа. Язык суховат и обложен белым налетом. С 3 дня можно обнаружить симптом Киари-Авцына – конъюнктивальную сыпь, располагающуюся на переходных складках конъюнктив в виде единичных петехий, а также энантему или симптом Розенберга на мягком нёбе, умеренную тахикардию и приглушенность тонов сердца, гипотонию. С 3 дня болезни часто увеличивается селезенка, что выявляется перкуторно, а позднее и пальпаторно. Отмечается умеренная одышка. В эти же сроки может наблюдаться тремор языка (симптом Говорова-Годелье), иногда девиация его, слабо выражен общий дрожательный синдром. С первых дней может наблюдаться инициальный бред, но чаще он проявляется в разгар болезни.

Период разгара болезни начинается с 4-5 дня вместе с появлением обильной розеолезно-петехиальной сыпи на розоватом фоне кожи боковых поверхностей туловища, спине, груди, живота, сгибательных поверхностей рук, бёдер. Размеры элементов обычно не более 3 мм. Иногда сыпь можно обнаружить на ладонной поверхности и почти никогда она не бывает на лице. Розеолы и петехии располагаются внутрикожно, поэтому они кажутся плоскими и расплывчатыми, с неровными краями. Точечные петехии можно обнаружить с помощью феномена жгута даже с третьего дня болезни. Элементы сыпи в течение 3-5 дней имеют розовую, ярко-красную или несколько цианотичную окраску, после чего розеолы бледнеют, а петехии становятся пигментированными. Через 7-9 дней от начала высыпания сыпь исчезает, оставляя на короткое время нечеткую пигментацию. Новых высыпаний при сыпном тифе, как правило, не бывает. У небольшого числа больных наблюдается только розеолёзная или розеолезно-папулёзная сыпь, иногда она может отсутствовать. Более выраженными становятся симптом щипка, пятна Киари-Авцына и энантема, а также нарушения со стороны сосудистого аппарата и центральной нервной системы. Заметно понижается артериальное давление, отмечается глухость тонов сердца и расширение границ его, электрокардиографически выявляются признаки диффузного миокардита. Усиливается головная боль и бессонница, нарастает слабость.

Возможен делирий с галлюцинациями и бредом. Характерны возбужденность больных, беспокойство, суетливость. Иногда в таком состоянии больные пытаются бежать, ведут себя буйно. Отмечаются оболочечные симптомы, характеризуемые как менингизм: слабо выраженные ригидность мышц затылка, симптом Кернига и Брудзинского при почти нормальной спинномозговой жидкости (цитоз не превышает 100 клетов). Выявляется более чёткая симптоматика поражения некоторых черепно-мозговых нервов, в частности, лёгкая сглаженность носо-губных складок. Типичны одутловатость лица и дрожание языка, девиация его, гиперестезия кожи. Почти у всех больных в большей или меньшей мере выражен общий тремор, могут наблюдаться снижение слуха, полиневриты, регистрируется одышка.

Аппетит значительно снижен или совершенно отсутствует, сильно беспокоит жажда. Язык сухой и обложен серогрязным налетом, может принимать бурую окраску, нередко появляются трещины. Печень и селезенка увеличены у большинства больных, отмечается задержка стула, метеоризм. Возможна олигурия, незначительная альбуминоурия и изредка парадоксальная ишурия. У тяжелобольных можно наблюдать непроизвольное мочеиспускание. Температура к 5-му дню болезни достигает максимальных цифр (39-40°С и выше) и в виде постоянной, реже ремитирующей длится в среднем до 12-14 дня болезни.

В сроки с 3-5 дня болезни преобладает тромбоцитопения, умеренный лейкоцитоз или тенденция к нему, нейтрофильная реакция, часто с некоторым палочкоядерным сдвигом, эозинопения, лимфопения, некоторое ускорение СОЭ. В период реконвалесценции кровь нормализуется, проходя стадию постинфекционного лимфоцитоза.

Выздоровление начинается со снижения температуры, которая нормализуется в течение 2-3 суток, уменьшения интоксикации и тифозного статуса. Появляется интерес к окружающему, улучшаются сон и аппетит, усиливается мочеотделение. К 3-5 дню нормальной температуры приходят к норме пульс и дыхание, уменьшаются до нормальных размеров печень и селезенка, восстанавливается артериальное давление. Однако у больных отмечается умеренная адинамия и слабость, сохраняется гиперестезия кожи. Через 7-8 дней эти явления исчезают. На 12-й день нормальной температуры, при отсутствии осложнений, больные могут быть выписаны, хотя полное выздоровление наступает примерно через месяц после нормализации температуры.

Болезнь может протекать в легкой, среднетяжелой, тяжелой и очень тяжелой форме. При легкой форме явления общей интоксикации незначительны, температура обычно не превышает 38°С, тифозное состояние всегда отсутствует, сознание не изменено или больные несколько заторможены, головная боль и бессонница умерены. Преобладает розеолёзная сыпь, петехии немногочисленны. Печень и селезенка увеличиваются примерно у трети больных, лихорадочный период длится до 9 дней и лишь иногда – 10-12 дней. легкая форма наблюдается у 10-20%больных. больные всегда выздоравливают.

Среднетяжелая форма наиболее типична с точки зрения выраженности симптомов и встречается чаще других – у 60-65% больных, сыпь розеолёзно-петехиальная. Температура достигает 38-39°С. лихорадочный период длиться в среднем 12-14 дней.

Для тяжелого сыпного тифа характерно более интенсивное развитие симптомов, особенно сосудистых и мозговых, вследствие значительной интоксикации. Пульс частый – 140 ударов в минуту. Артериальное давление падает до 70-80 мм рт. ст. (максимальное). Тоны сердца глухие, акроцианоз. Отмечается тахипное, возможно нарушение ритма дыхания. Кроме рано появляющихся резкого возбуждения резкого возбуждения, сыпнотифозного делирия, которые быстро сменяются тормозной реакцией, можно отметить менингеальный синдром вплоть до появления судорог, нарушения глотания, дизартрию и т.д. Температура достигает 40-41°С. сыпь преимущественно петехиальная, с возможными истинными геморрагиями, что является грозным признаком. Тяжелая форма встречается у 10-15% больных.

В качестве очень тяжелых форм раньше описывался и так называемый молниеносный тиф, когда вследствие тяжёлой интоксикации и изменений в надпочечниках больные погибали в состоянии коллапса. Тяжелое и очень тяжелое течение чаще наблюдается у пожилых людей. Иногда встречаются атипичные формы болезни, когда те или иные симптомы отсутствуют или проявляются в нехарактерном для сыпного тифа виде.

Болезнь Брилла (син.: повторный сыпной тиф, рецидивный сыпной тиф) – острая циклическая инфекционная болезнь, проявляющаяся через многие годы у лиц, переболевших эпидемическим сыпным тифом. Она характеризуется спорадичностью заболеваний при отсутствии вшивости, более легким, чем при эпидемическом сыпном тифе, течением и типичным клиническим симптомокомплексом. В условиях завшивленности больные болезнью Брилла могут явиться источником заболеваний эпидемическим сыпным тифом. Патогенез и клиническая картина при болезни Брилла та же, что и при эпидемическом сыпном тифе, но относительно менее выражена риккетсиозная интоксикация.

## Осложнения

Возможно развитие коллапса, тромбозов, тромбоэмболий, разрывов мозговых сосудов, с явлениями парезов и даже параличей, кишечных кровотечений, миокардита, инфаркта миокарда, психозов периода реконвалесценции и более поздних, полирадикулоневритов, поражений ядер черепно-мозговых нервов, а также вторичных пневмоний, отитов и паротитов, абсцессов, фурункулёза, пиелита, пиелоцистита.

## Диагностика и дифференциальная диагностика

В начальном периоде сыпной тиф может быть диагностирован по характерной клинической картине, так как методов лабораторного подтверждения диагноза в эти сроки не существует. С помощью серологических реакций диагностика болезней возможна не ранее 8-10 дня болезни. В качестве последних используются высокочувствительные РНГА с риккетсиями Провачека и РСК. Реакция агглютинации с риккетсиями Провачека технически более проста и доступна, но для её постановки требуется большое количество диагностикума и не всегда чётко выражены результаты. Диагностическим титром при однократной постановке РА является 1:160 (и 1:40 – в микроскопической модификации), для РСК – 1:160 и для РНГА – 1:1000. Но более правильное динамическое наблюдение за нарастанием титров антител. В начальном периоде эпидемический сыпной тиф необходимо дифференцировать с гриппом, очаговой пневмонией, менингитом, геморрагическими лихорадками, а в разгар болезни – с брюшным тифом и паратифами, клещевым сыпным тифом, орнитозом, лекарственной болезнью, трихинеллёзом, различными эритемами и т.д.

Чаще всего в начале болезни сыпной тиф диагностируется как грипп. Однако, при наличии сходных жалоб и некоторых объективных данных (гиперемия лица, шеи и конъюнктив, тахикардия), грипп отличается от сыпного тифа более острым началом), больной называет не только день, но и час начала болезни), резкой слабостью в первый же день болезни, наличием обильной постоянной потливости, отсутствием одутловатости лица и амимии его, а также симптома Говорова-Годелье. При гриппе не бывает сыпи и спленомегалии. Головная боль локализуется обычно в области лба, надбровных дуг и височных областях, характерна боль при надавливании на глазные яблоки и при движении ими.

При геморрагических лихорадках, особенно с почечным синдромом, более выражена гиперемия лица и конъюнктив, сыпь носит характер необильных точечных геморрагий, чаще выявляется на боковых поверхностях туловища и в подмышечных областях; обычна рвота и икота, боли в пояснице и животе; типична жажда и олигурия. Характерен эритроцитоз, но нормальная или ускоренная СОЭ, значительное повышение остаточного азота крови, гематурия, альбуминоурия, цилиндроурия.

Для брюшного тифа характерна бледность кожных покровов лица, общая адинамия и вялость. Язык утолщен, обложен, с отпечатками зубов по краям и на кончике. Часто отмечается брадикардия с дикротией пульса. Обычен метеоризм и урчание в правой подвздошной области, более позднее увеличение печени и селезенки. Сыпь скудная розеолёзная, появляется не ранее 8 дня болезни на груди, животе и боковых поверхностях туловища. В крови лейкопения с эозинопенией, палочноядерные сдвиг с относительным лимфоцитозом, тромбоцитопения.

Дифференциация сыпного тифа и клещевого сыпного тифа Северной Азии, встречающегося в районах Сибири и Дальнего востока, основывается на характерных симптомах последнего: наличие у большинства больных первичного аффекта, представляющего собой плотный инфильтрат коричневогоили бурого цвета до 1,5 см в диаметре с возможным некрозом в центре, регионарного лимфаденита, который развивается почти одновременно с первичным аффектом, розеолезно-папулезной яркой сыпи на всех участках тела, появляющегося на 2-4 день болезни.

## Лечение

Лечение больных сыпным тифом должно проводится только в условиях стационара. Строгий постельный режим до 5-6 дня нормальной температуры.

## Этиотропная терапия

Тетрациклин внутрь по 300-400 мг 4 раза в сутки или

Доксациклин по 100 мг каждые 12 часов (взрослыми), по 5 мг/кг каждые 24 часа (детям старше 8 лет) или

Хлорамфеникол (взрослым, беременным, детям до 8 лет) – начальная доза 50 мг/кг, затем 50 мг/кг в сутки каждые 6-8 часов.

При тяжелом течении тетрациклин или хлорамфеникол вводят парентерально. Отменяют антибиотики с 3-го дня нормальной температуры.

## Патогенетическая терапия

Инфузионная терапия с целью дезинтоксикации. При тяжелом течении заболевания целесообразно применение глюкокортикоидов, сердечных гликозидов, седативной терапии (дитазепам, бромиды и др.)

Больной выписывается из стационара не ранее 12-го дня нормальной температуры. После выписки из стационара больные нуждаются в наблюдении невропатологом до нормализации функции ЦНС, а при наличии миокардита – наблюдение терапевта.

Выявление, учет и регистрация больных сыпным тифом

Больные сыпным тифом и болезнью Брилля выявляются из числа лихорадящих больных, обратившихся за медицинской помощью (в поликлинике или на дому) и среди контактных с больными этой инфекцией.

Все больные с лихорадкой неясного генеза, продолжающейся более 5 дней, в том числе и лихорадящие контактные с больным сыпным тифом и болезнью Брилля, подлежат провизорной госпитализации в инфекционные стационары. При амбулаторном наблюдении и лечении таких больных им обязательно проводится не менее чем двукратное серологическое обследование на сыпной тиф 6-го дня болезни с интервалом 3-5 дней.

Все лихорадящие больные с клинически установленным диагнозом сыпного тифа и болезни Брилля подлежат 100-процентной госпитализации в инфекционные стационары. Все перечисленные выше госпитализированные больные подлежат обязательному, не менее чем двукратному серологическому обследованию на сыпной тиф, с 6-го дня болезни с интервалом 3-5 дней.

При обращении больного сыпным тифом и болезнью Брилля за медицинской помощью в период реконвалесценции, его госпитализация осуществляется по клиническим показаниям, но двукратное серологическое обследование и проведение противоэпидемических мероприятий в очаге – обязательно.

Амбулаторные карты госпитализированных больных (провизорно и больных сыпным тифом), так же как и оставленных для лечения и обследования больных с лихорадкой неясной этиологии на дому, находятся в КИЗ и ПР или при его отсутствии у врача ГСВ до выписки из стационара и завершения лечения в амбулаторных условиях.

О каждом случае заболевания сыпным тифом, болезнью Брилля или подозрения на эти заболевания и медицинские работники обязаны в день выявления больного сообщить в СЭС по телефону с последующим направлением письменного экстренного извещения (форма № 058/у).

Каждый случай заболевания сыпным тифом и болезнью Брилля или подозрение на них регистрируются в лечебно-профилактическом учреждении по месту их выявления в журнале учета инфекционных заболеваний (форма № 060/у).

В СЭС производится немедленная регистрация в журнале учета инфекционных заболеваний по вышеназванной форме каждого случая подачи экстренного извещения и проводятся соответствующие противоэпидемические мероприятия. Сверка правильности регистрации подтвержденных больных с диагнозами сыпного тифа и болезни Брилля осуществляется ежемесячно, после чего эти данные вносятся в отчетную форму № 85-инфекция.

Эндемический сыпной тиф (блошиный)

Острый доброкачественный зоонозный риккетсиоз протекающий с высокой лихорадкой и распространенной розеолезно-папулезной сыпью.

Вероятный случай - остро развившееся лихорадочное состояние, сопровождающееся общетоксическими симптомами и появлением на 4-7 день болезни обильной розеолезной или розеолезно-папулезной сыпи повсеместно, включая лицо, ладонную и подошвенную поверхности. Эпидемиологически - наличие в окружающей среде крыс, мышей.

Подтвержденный случай - лабораторное подтверждение, при вышеописанной клинической картине, серологическими реакциями (РСК и РНГА) проводимыми одномоментно с антигенами из R. рrowazekii и R. typhi (mooseri) и при преобладании титра антител к R. typhi.

Этиология:

Возбудитель R. mooseri по своим морфобиологическим свойствам сходен с R. prowazekii. Антигенные различия этих родственных видов микроорганизмов связаны с видоспецифическим термолабильным антигеном, выявление которого лежит в основе их серологической дифференциации.

Эпидемиология:

Тиф блошиный эндемический - зоонозный, трансмиссивный риккетсиоз. Естественным резервуаром возбудителя в природе являются грызуны - крысы, мыши и их эктопаразиты - блохи и гамазовые клещи.У грызунов риккетсии Музера выделяются во внешнюю среду с мочой. Основными переносчиками риккетсий являются крысиные блохи - Xenopsylla cheopis, Ceratophyllus faciatus, выделяющие риккетсии с испражнениями. Переносчиками риккетсий могут служить и человеческая блоха - Pullex irritans, и крысиный клещ - Bdelonyssus bacoti, способный к трансовариальной передаче риккетсий Музера.

Заражение человека происходит алиментарным путем через продукты, загрязненный мочой больных грызунов, контактным механизмом при втирании в поврежденную кожу и слизистые оболочки инфицированных риккетсиями фекалий переносчиков или аэрогенным механизмом при вдыхании воздуха с взвешенным инфицированным материалом. Через укусы зараженных блох риккетсии человеку не передаются, но возможно заражение при укусе инфицированных клещей.

Среди людей блошиный эндемический тиф наблюдается круглогодично как спорадическое заболевание, но с подъемом в летне-осеннее время. Заболеванию подвержены все возрастные группы. От человека к человеку возбудитель не передается. Болезнь распространена преимущественно в портовых городах теплой климатической зоны.

Патогенез и патологическая анатомия:

Сходством биологических свойств риккетсий Музера и Провацека, по - видимому, объясняется общность патоморфологической картины и патогенеза эндемического блошиного и эпидемического сыпного тифа. Ввиду редких летальных исходов патологическая анатомия эндемического блошиного тифа изучена недостаточно.

Клиника:

Эндемический блошиный сыпной тиф - острая циклическая болезнь, в течении которой выделяют периоды: инкубационный, начальный, разгара и реконвалесценции.

Инкубационный период в среднем длится 5-15 дней.

Начало болезни чаще острое, с появления головной боли, артралгий, миалгий, озноба. Подъем температуры может быть быстрым или постепенным, достигая 38 -400 к концу 1-й недели болезни. Температурная реакция постоянного или ремитирующего типа, продолжительностью около 1-2 нед., разрешение ее происходит путем ускоренного лизиса, нередко со значительными колебаниями температуры. Лихорадочная реакция сопровождается другими общетоксическими симптомами - головной болью, снижением аппетита, астенией, миалгиями.

На 4-7-й день болезни у большей части больных появляется обильная розеолезная или розеолезно-папулезная сыпь, локализующаяся на груди, животе, конечностях, в том числе на ладонной и подошвенной поверхности и на лице. Через 7 - 10 дней сыпь исчезает, не оставляя следа, у 1/4 больных сыпь отсутствует.

Нервная система у большинства больных поражается незначительно, status typhosus, бред, менингиальные явления наблюдаются исключительно редко. Поражение сердечно - сосудистой системы проявляются гипотонией и наклонностью к брадикардии. В легких могут быть явления бронхита. Печень и селезенка обычно не увеличены. В гемограмме вначале определяются лейкопения, затем лейкоцитоз с лимфоцитозом. Осложнений не наблюдается.

Прогноз: благоприятный.

Диагностика:

Распознавание эндемического блошиного тифа основано на клинических, эпидемиологических, и лабораторных данных.

Для специфической диагностики применяют серологические методы (РСК, РНГА) с антигенами из риккетсий Музера и Провацека. Диагноз решает отчетливое преобладание титра антител в реакции с антигенами из R.mooseri по сравнению с антигенами из R.prowazekii. Изредка используют биологическую пробу (скротальную реакцию)

Лечение:

Аналогично таковому при эпидемическом сыпном тифе. Применяют тетрациклин по 0,2 г. 4 раза на протяжении лихорадочного периода и 1-го дня апирексии.

Профилактика:

Больной эндемическим блошиным тифом незаразен для окружающих и обязательной госпитализации не подлежит. Профилактические мероприятия должны быть направлены на уничтожение источников инфекции - крыс, мышей и их эктопаразитов, что достигается дератизацией и дезинсекцией, на охрану пищевых продуктов от загрязнения выделениями грызунов.

Начальник ГУОМПиЛ Т.С. Кутукеев