

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

_____ Д.Л. Пиневиц

« 27 » декабря 2013 г.

Регистрационный № 192-1113

**КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА КЛЕЩЕВЫХ
МИКСТ-ИНФЕКЦИЙ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ - РАЗРАБОТЧИКИ:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»

Государственное учреждение образования «Минский государственный медицинский университет»

Учреждение здравоохранения «Городская клиническая инфекционная больница» г. Минска

АВТОРЫ:

кандидат медицинских наук С.А. Дракина, кандидат медицинских наук Т.А. Рогачева, Л.А. Анисько, кандидат биологических наук Е.П. Счесленок, Л.В. Корбут, Е.В. Тимофеева, О.Р. Князева

Минск, 2013

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкции) представлены методы диагностики смешанных инфекций, передаваемых человеку при присасывании зараженных клещей.

Инструкция предназначена для врачей-инфекционистов, врачей-неврологов, врачей лабораторной диагностики, иных врачей – специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с инфекционными заболеваниями, возбудители которых передаются через клещей.

1. Показания и противопоказания к применению

Показания к применению:

- Клиническая диагностика смешанных и моно- инфекций передаваемых при присасывании клещей,
- лабораторная верификация диагностируемых инфекций.

Противопоказания для применения:

- отсутствие условий для работы с возбудителями третьей группы патогенности.

2. Перечень необходимого оборудования, реактивов и материалов

Оборудование и материалы для сбора клинических образцов и биопроб

Шприцы одноразовые стерильные 5 мл или вакуутэйнеры 5 мл для забора крови из вены.

Стерильные иглы, стерильные пластиковые или стеклянные пробирки для забора ликвора, синовиальной жидкости.

Пробирки типа Эппендорф, пластиковые контейнеры для сбора клещей.

Оборудование и материалы для проведения серологических исследований

Прибор для учёта и документирования иммуноферментных реакций (ИФА-ридер) в комплекте с прибором для промывки планшет.

Микроскоп люминисцентный.

Микроскоп световой.

Предметные и покровные стёкла для приготовления мазков крови и проведения исследований методом РИФ и световой микроскопии.

Пробирки для приготовления разведений.

Автоматические пипетки с переменным объемом до 10, 20–200, 100–1000 мкл.

Стерильные одноразовые наконечники с фильтром.

Пластиковые микропробирки объемом 1,5 и 0,2 мл.

Холодильник бытовой (+2– +8°C), с морозильным отделением.

Реагенты для проведения серологических исследований

Набор диагностический для проведения исследований методом иммуноферментного анализа (ИФА),

Набор диагностический для проведения исследований методом непрямой иммунофлуоресценции (НРИФ).

Набор диагностический для проведения исследований методом иммуноблоттинга.

Фосфатно-солевой буфер или 0,9% раствор хлорида натрия.

Вода дистиллированная.

Оборудование и материалы для проведения ПЦР

Прибор для проведения реакции – термоциклер.

Вортекс-шейкер.

Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф», 12 тыс. об/мин.

Ламинарный бокс, класс биозащиты II.

Холодильник бытовой (+2– +8°C), с морозильным отделением.

Магнитная мешалка с подогревом

Источник постоянного тока для электрофореза.

Камера для горизонтального электрофореза.

Прибор для детекции нуклеиновых кислот в УФ-лучах с системой документации (трансиллюминатор).

Автоматические пипетки с переменным объемом до 10, 20–200, 100–1000 мкл.

Стерильные одноразовые наконечники с фильтром.

Пластиковые микропробирки объемом 1,5 и 0,2 мл.

Реагенты для проведения ПЦР

Набор для выделения ДНК/РНК из образцов сыворотки крови, ликвора, биопроб.

Набор реагентов для проведения обратной транскрипции

Набор реагентов для проведения исследований клинического материала и биопроб на передаваемые клещами инфекции, методом ПЦР в режиме реального времени или ПЦР с электрофоретической детекцией.

Комплект диагностических праймеров

Вода деионизованная, свободная от нуклеаз.

Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ).

Taq ДНК-полимераза (5 ед/мкл).

10× буфер для *Taq* полимеразы.

MgCl₂, 25 мМ раствор.

Маркер молекулярного веса 50 п.о или 100 п.о.

Агароза типа NeeO.

50x TAE буфер или 10x TBE буфер .

Буфер для загрузки образцов в гель (60% глицерин; 60 мМ ЭДТА; 10 мМ Трис-HCl, pH 8,0; 0,04% бромфеноловый синий; 0,04% ксилен цианол).

Бромистый этидий 10 мкг/мл.

Клещевые инфекции – это группа инфекционных трансмиссивных природноочаговых заболеваний, переносимых клещами. Наиболее значимы для нашей территории клещи рода *Ixodes* (*I. ricinus*, *I. persulcatus*) и рода *Dermacentor*, которые являются переносчиками вирусных, бактериальных и протозойных инфекций, причем один и тот же клещ может быть переносчиком до 8 патогенных для человека агентов – возбудителей болезни Лайма, клещевого энцефалита, гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ), моноцитарного эрлихиоза человека (МЭЧ), риккетсиозов и пр. При присасывании мультизараженного клеща у человека может развиваться как моноинфекция, так и несколько клещевых инфекций в различных сочетаниях и разнообразных клинических формах с нарастанием общеинфекционных и очаговых проявлений.

Настоящая инструкция описывает методы, направленные на раннюю диагностику и предупреждение развития хронического процесса у пациентов с Лайм-боррелиозом, клещевым энцефалитом, анаплазмозом при сочетанных инфекциях.

3. Алгоритм клинической диагностики передаваемых клещами инфекций

Клинико-лабораторные симптомы, выявление которых требует лабораторного обследования

Предварительные диагнозы, поставленные при поступлении пациентов в клинику, отражают весь спектр клинических признаков, встречающихся при клещевом энцефалите (КЭ) и болезни Лайма (ЛБ): эритема, лихорадка, головная боль, в ряде случаев сопровождавшаяся тошнотой и рвотой, головокружение, слабость, менингеальный синдром, очаговая неврологическая симптоматика, диарея, признаки ОРВИ.

Клинические проявления клещевого энцефалита

Выделяют пять клинических форм клещевого энцефалита: 1) лихорадочную (стертую); 2) менингеальную; 3) менингоэнцефалитическую; 4) полиомиелитическую; 5) полирадикуло-невритическую.

1) Лихорадочная форма клещевого энцефалита характеризуется благоприятным течением с быстрым выздоровлением. Продолжительность лихорадки – 3-5 дней. Основными клиническими признаками ее являются токсико-инфекционные проявления: головная боль, слабость, тошнота – при слабо выраженной неврологической симптоматике. Показатели ликвора без отклонений от нормы.

2) Менингеальная форма. Пациенты жалуются на сильную головную боль, усиливающуюся при малейшем движении головы, головокружение, тошноту, однократную или, многократную рвоту, боли в глазах, светобоязнь. Они вялы и заторможены. Определяется ригидность мышц затылка, симптомы Кернига и Брудзинского. Менингеальные симптомы держатся на протяжении всего лихорадочного периода. Иногда они определяются и при нормальной температуре. Продолжительность лихорадки в среднем 7-14 дней. В ликворе – умеренный лимфоцитарный плеоцитоз до 100-200 в 1 мм³, увеличение белка.

3) Менингоэнцефалитическая форма. Эта форма клещевого энцефалита отличается более тяжелым течением. Характерна для сибирского и дальневосточного подтипа возбудителя. Нередко наблюдаются бред, галлюцинации, психомоторное возбуждение с утратой ориентировки в месте и во времени. Могут развиваться эпилептические припадки. Различают диффузный и очаговый менингоэнцефалит. При диффузном менингоэнцефалите выражены общемозговые нарушения (глубокие расстройства сознания, эпилептические припадки вплоть до эпилептического статуса) и рассеянные очаги органического поражения

мозга в виде псевдобульбарных расстройств (нарушение дыхания в виде бради- или тахипное, по типу Чейн-Стокса, Куссмауля и др.), неравномерности глубоких рефлексов, асимметричных патологических рефлексов, центральных парезов мимической мускулатуры и мышц языка. При очаговом менингоэнцефалите быстро развиваются капсулярные гемипарезы, парезы после джексоновских судорог, центральные монопарезы, миоклонии, эпилептические припадки, реже - подкорковые и мозжечковые синдромы. В редких случаях (как следствие нарушения вегетативных центров) может развиваться синдром желудочного кровотечения с кровавой рвотой. Характерны очаговые поражения черепных нервов III, IV, V, VI пар, несколько чаще VII, IX, X, XI и XII пар. Позднее может развиваться кожевниковская эпилепсия, когда на фоне постоянного гиперкинеза появляются общеэпилептические припадки с потерей сознания.

4) Полиомиелитическая форма клещевого энцефалита наблюдается почти у трети пациентов. Характеризуется продромальным периодом (1-2 дня), в течение которого отмечаются общая слабость и повышенная утомляемость. Затем выявляются периодически возникающие подергивания мышц фибриллярного или фасцикулярного характера, отражающие раздражение клеток передних рогов продолговатого и спинного мозга. Внезапно может развиваться слабость в какой-либо конечности или появление чувства онемения в ней (в дальнейшем в этих конечностях нередко развиваются выраженные двигательные нарушения). В последующем на фоне фебрильной лихорадки (1-4-й день первой лихорадочной волны или 1-3-и день второй лихорадочной волны) и общемозговых симптомов развиваются вялые парезы шейно-плечевой (шейно-грудной) локализации, которые могут нарастать в течение нескольких дней, а иногда до 2 нед. Наблюдаются симптомы, описанные

А. Пановым ("свисающая на грудь голова", "горделивая осанка", "согбенная сутуловатая поза", приемы "туловищного забрасывания рук и запрокидывания головы". Полиомиелитические нарушения могут сочетаться с проводниковыми, обычно пирамидными: вялые парезы рук и спастические - ног, комбинации амиотрофий и гиперфлексии в пределах одной паретической конечности. В первые дни болезни у пациентов с этой формой клещевого энцефалита часто резко выражен болевой синдром. Наиболее характерная локализация болей в области мышц шеи, особенно по задней поверхности, в области надплечий и рук. Нарастание двигательных нарушений при клещевом энцефалите продолжается до 7-12 дней. В конце 2-3-й недели болезни развивается атрофия пораженных мышц.

5) Полирадикулоневритическая форма клещевого энцефалита характеризуется поражением периферических нервов и корешков. У пациентов появляются боли по ходу нервных стволов, парестезии (чувство "ползания мурашек", покалывание). Определяются симптомы Лассега и Вассермана. Появляются расстройства чувствительности в дистальных отделах конечностей по полиневральному типу. Как и другие нейроинфекции, клещевой энцефалит может протекать по типу восходящего спинального паралича Ландри. Вялые параличи в этих случаях начинаются с ног и распространяются на мускулатуру туловища и рук. Восхождение может начинаться и с мышц плечевого пояса, захватывать шейные мышцы и каудальную группу ядер продолговатого мозга.

Клинические проявления болезни Лайма

1). Ранняя локализованная стадия (3-30 дней после укуса клеща):

Выделяют 2 формы: с мигрирующей эритемой и безэритемная. Каждая форма может сопровождаться общеинфекционным синдромом.

Мигрирующая эритема начинается с небольшого пятна, которое "мигрируя" центробежно, постепенно увеличивается. В типичных случаях центр пятна светлеет, а периферические участки образуют яркий красный валик в виде кольца неправильной формы диаметром от 3 до 70 см, в среднем 15 см. Одна из особенностей эритемы - относительно длительное сохранение ее по сравнению с другими воспалительными изменениями кожи. Пациенты часто отмечают чувство жжения, нарушения кожной чувствительности (парестезии) и небольшой зуд в области эритемы. Иногда наблюдаются спонтанные кратковременные мышечные подергивания вокруг эритемы. Явления воспаления в области эритемы обычно сохраняются без лечения несколько недель. После разрешения эритемы, в месте ее локализации, примерно у половины всех пациентов отмечается шелушение кожи, которое сохраняется от нескольких дней до 3 недель, в ряде случаев, наблюдается гиперпигментация кожи, которая обычно исчезает в течение нескольких месяцев. Иногда у пациентов с мигрирующей эритемой имеется локальный болевой синдром в месте укуса иксодового клеща, что может быть одним из проявлений часто наблюдающихся невритов кожных ветвей нервов. Если при исследовании ликвора выявляются признаки воспаления, то это свидетельствует об уже произошедшей диссеминации возбудителей ЛБ в нервную систему.

В **безэритемной** форме наблюдается умеренно выраженный синдром общей инфекционной интоксикации - лихорадка, чаще субфебрильная, чувство ломоты в теле и головные боли.

Клинические проявления болезни Лайма при смешанной инфекции

При микст-инфекции клинически заболевание в этих случаях протекает тяжелее: отмечается продолжительная лихорадка, более интенсивная головная боль, сопровождающаяся рвотой.

2). Ранняя диссеминированная стадия (несколько дней до месяца после укуса клеща).

Развивается дополнительная мигрирующая эритема в других областях тела, паралич Белла (потеря мышечного тонуса на одной или обеих сторонах лица). Сильные головные боли и ригидность затылочных мышц из-за менингита. Боль и отек в крупных суставах (например, колени). Стреляющие боли, которые могут мешать сну. Учащенное сердцебиение и головокружение. Многие из этих симптомов исчезают в течение нескольких недель или месяцев, даже без лечения. Однако, отсутствие лечения может привести к дополнительным осложнениям.

3). Стадия позднего диссеминирования (от месяца до года после укуса клеща).

Характеризуется развитием хронического атрофического акродерматита (ХААД), поражением нервной системы и опорно-двигательного аппарата.

Микроорганизмы *Borrelia burgdorferi s.l.* могут поражать все отделы **нервной системы**, что проявляется широким спектром клинических симптомов и синдромов.

Стоит отметить определенную этапность появления симптомов при поражении нервной системы:

- присасывание клеща;
- возникновение мигрирующей эритемы (в случае указания факта присасывания клеща) после инкубационного периода, составляющего в среднем 12 дней;
- появление корешковых болей в среднем через 10-15 дней (интервал от 0 до 95 дней) после появления мигрирующей эритемы;

- возникновение другой неврологической симптоматики в среднем через 40 дней после появления мигрирующей эритемы (интервал от 0 до 150 дней).

Диагностические критерии боррелиозного поражения нервной системы:

- неврологические синдромы неясной этиологии,
- количество клеток в 1 мл ликвора больше 4;
- повышенный интратекальный синтез противоборрелиозных антител,
- спинальный или черепной радикулоневрит (синдром Баннварта),
- количество клеток в 1 мл ликвора выше 50, количество общего белка $> 0,5$ г/л и повышенный интратекальный синтез антител;
- положительные результаты серологических исследований крови.
- мигрирующая эритема (диаметр более 5 см) или ХААД - начало периферического неврологического синдрома или признаков поражения центральной нервной системы в пределах 2 месяцев после возникновения кожных проявлений;

Диагноз ЛБ может быть установлен, если наблюдается один из описанных выше критериев.

Поражение **опорно-двигательного аппарата** сопровождается артралгиями, (от 20 до 60% пациентов), которые не являются признаками воспалительных изменений в суставе, и артритами. Артрит развивается через несколько недель (4-6) от начала болезни или после мигрирующей эритемы, поражение суставов достаточно часто встречается при боррелиозе в безэритемной форме. Наибольшее число новых случаев вовлечения суставов в патологический процесс отмечается в первые 3 месяца заболевания (в 65%). В начале заболевания поражение суставов носит, как правило, умеренный характер. По мере прогрессирования ЛБ

суставной синдром становится более выраженным, проявляя отчетливую тенденцию к хронизации и напоминает по течению аутоиммунный ревматоидный артрит.

Клинически артрит при ЛБ проявляется в виде моно- или олигоартрита, обычно крупных суставов: до 50% - это коленные суставы, 30% - плечевые, 20-25% локтевые и голеностопные. Вовлечение в процесс одного сустава отмечается у трети пациентов, в несколько большем проценте имеется одновременное поражение двух-трех суставов (до 40%). Патоморфологическая и клиническая характеристика поражения суставов при ЛБ практически не отличается от таковой при других острых формах артритов. Выявляется суставной выпот с ограничением подвижности и сглаживанием контуров сустава. Может наблюдаться гиперемия кожи и локальное повышение температуры в месте пораженного сустава, однако болевой синдром выражен умеренно.

Течение болезни характеризуется обострениями и ремиссиями. Продолжительность обострений может длиться от нескольких дней до месяцев, в среднем до недели. Без лечения самостоятельная ремиссия (длительная) обычно наступает через 6-7 месяцев активного процесса. Приблизительно 15% острых артритов переходят в хроническое течение. При длительном течении ЛБ примерно у 10% пациентов развиваются небольшие сгибательные контрактуры, обусловленные изменениями связочного аппарата. Хроническое течение может привести к анкилозу.

К клиническим симптомам **поражения сердца** при ЛБ относят кардиалгии, сердцебиения, одышку, головокружение и кратковременные синкопальные состояния, возникающие на фоне других проявлений заболевания. В 5-25% у пациентов с боррелиозным поражением сердца диагностируется миокардит боррелиозной этиологии, иногда с признаками недостаточности кровообращения. Поражение сердца не

бывает изолированным, всегда имеются поражения и других органов (лимфаденопатия, поражение центрального и периферического отделов нервной системы, кожи, опорно-двигательного аппарата и др.)

При ЛБ может наблюдаться достаточно широкий спектр воспалительных изменений со стороны **органа зрения**: изолированный передний или средний увеит, хориоидит и даже панувеит. Предполагается, что патогенез их развития связан как с непосредственным воздействием боррелий на орган зрения, так и с опосредованным влиянием возбудителей, за счет иммунопатогенного действия на ткани глаза.

Острый конъюнктивит достаточно часто регистрируется у пациентов с острым боррелиозом и наблюдается примерно у каждого десятого - пятнадцатого пациента с мигрирующей эритемой. У пациентов с хроническим ЛБ конъюнктивит часто носит длительный и рецидивирующий характер, и может служить одним из заметных клинических симптомов этой инфекции.

Иногда при ЛБ наблюдаются признаки поражения других органов и систем: **печени, селезенки, почек или легких**. У пациентов при остром и подостром ЛБ, приблизительно в 25-30% случаев, при биохимическом исследовании крови определяются повышенные уровни активности печеночных ферментов. Эти признаки поражения печени носят преходящий характер и достаточно быстро исчезают на фоне этиотропной терапии.

Клинические проявления гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ)

Возбудитель ГАЧ — бактерия *Anaplasma phagocytophilum*. Это внутриклеточный мелкий паразит, размножающийся в гранулоцитах (лейкоциты), что приводит к воспалительным процессам во внутренних органах.

Инкубационный период длится от 3 до 23 дней (в среднем 2 недели). Спектр клинических проявлений варьирует от бессимптомного до тяжелых форм с развитием полиорганной недостаточности, а в отдельных случаях до летального исхода.

Анаплазмоз начинается с острой неспецифической лихорадки ($>38,5^{\circ}\text{C}$), озноба, сильной головной, мышечной, боли в животе, слабости, тошноты, рвоты, диареи, кашля, миалгий (артралгий). Лихорадочный период длится от 2 до 10 дней. Могут развиваться безжелтушный гепатит и поражение почек: гипоизостенурия, протеинурия, эритроцитурия; потеря аппетита, явления катарального фарингита, лимфаденопатия, повышение уровня печеночных трансаминаз, рентгенографические изменения в легких. У большинства пациентов пониженное артериальное давление. Высыпания на коже и нарушение ориентации крайне редки.

Наиболее часто при ГАЧ регистрируется тромбоцитопения (68%) и лейкопения (60%), обычно сопровождающиеся нарушением функции печени в виде повышения активности АСТ, АЛТ и — чаще всего — ЛДГ. Увеличение концентрации С-реактивного белка.

К более редким изменениям относят анемию, повышение сывороточной концентрации креатинина и азота мочевины в крови. Диагностика ГАЧ по клиническим данным весьма затруднительна, поскольку однозначных симптомов не отмечается, а часть пациентов не имеет никаких клинических проявлений.

Осложнения при ГАЧ как моноинфекции наблюдаются редко, тяжесть течения усиливается при **клещевых вирусно-бактериальных микст-инфекциях**. При осложнениях — дыхательная и почечная недостаточность, поражения нервной системы.

4. Лабораторная диагностика инфекций, передаваемых клещами

4.1. Сбор, хранение и транспортировка образцов для лабораторной диагностики

Все манипуляции по забору, транспортировке, хранению проб для проведения исследований смешанных клещевых инфекций проводят в соответствии с Руководством «Порядок учета, хранения, передачи и транспортировки микроорганизмов I-IV групп патогенности» № 11-7-13-2002, утвержденным Главным государственным санитарным врачом Республики Беларусь 30 декабря 2002 г.

1). Забор крови для проведения клинических и серологических исследований (выявление IgM и IgG) осуществляется в первые дни заболевания и затем в динамике в зависимости от особенностей иммунного ответа в отношении конкретного возбудителя: для клещевого боррелиоза – 4 неделя с момента заражения, для КЭ, анаплазмоза и эрлихиоза – 2 неделя от начала заболевания.

Забор крови проводят натошак из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8-1,1 мм) в одноразовый шприц объемом 5 мл или в пробирки типа вакуэтэйнер. При заборе в шприц кровь из него аккуратно переносят в одноразовую стерильную пробирку с завинчивающейся крышкой без антикоагулянта (получение сыворотки). Для получения сыворотки пробирки с кровью отстаивают при комнатной температуре (либо в термостате при 37°C) в течение 30 мин до образования сгустка крови, затем центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре. После центрифугирования сыворотку отбирают стерильными наконечниками с фильтром в стерильные пластиковые пробирки объемом 1,5 мл.

2). Для проведения молекулярно-биологических исследований (ПЦР) используется плазма крови. Забор крови производится на ранних сроках

заболевания (до 14 дней от начала заболевания) в пробирки типа вакутайнер с антикоагулянтом (6% раствор ЭДТА в соотношении 1:20). Пробирку аккуратно переворачивают несколько раз (для перемешивания с антикоагулянтом). Плазму крови получают центрифугированием пробирок с цельной кровью при 800-1600g (3000 об/мин) в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем отбирают плазму в объеме не менее 1 мл отдельными наконечниками с аэрозольным барьером в стерильные пробирки объемом 1,5 мл.

В связи с низкой концентрацией возбудителей клещевых инфекций в плазме крови и ликворе, рекомендуется проводить концентрирование материала перед этапом выделения нуклеиновых кислот. Концентрирование материала проводится путем центрифугирования плазмы крови и ликвора при 12 000 об/мин в течение 20 мин, осадок и нижняя фракция (100-200 мкл) используются для выделения нуклеиновых кислот на коммерческих наборах для пробоподготовки материала к дальнейшему анализу методом ПЦР, разрешенные к применению на территории Республики Беларусь.

До начала проведения исследований условия хранения образцов следующие.

Образцы цельной крови:

при температуре 2-25°C в течение 12 часов с момента взятия крови для качественного определения нуклеиновых кислот;

при температуре 2-8°C в течение 1 суток для качественного определения РНК/ДНК инфекционных агентов;

Недопустимо замораживание образцов цельной крови!

Образцы плазмы, сыворотки, синовиальной жидкости и ликвора:

при температуре 2-8°C – до 5 суток;

при температуре -70°C – длительно (не менее года).

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала, поэтому образцы для длительного хранения необходимо разлить небольшими (0,1-0,2 мл) порциями в отдельные стерильные пробирки объемом 1,5 мл.

3). С целью выявления фагоцитов и гранулоцитов, инфицированных анаплазмами или эрлихиями, в первые дни заболевания готовят тонкие мазки крови.

4). При наличии неврологической симптоматики, указывающей на поражение ЦНС, производится забор спинномозговой жидкости. Материал забирается в стерильные пластиковые пробирки.

5). При наличии объективных признаков артрита (предположительно боррелиозной этиологии) производится забор синовиальной жидкости из полости пораженных суставов по общепринятой методике. Материал забирается в стерильные пластиковые пробирки.

4.2. Лабораторная диагностика клещевого энцефалита

Проводиться согласно разработанному алгоритму, изложенному в Приложении 1 настоящей Иструкции.

В лабораторной диагностике вирусного клещевого энцефалита используют методы серологического тестирования с определением специфических IgM и IgG. Для выявления специфических антител к вирусу КЭ в клинических образцах пациентов и реконвалесцентов методом иммуноферментного анализа (ИФА) может быть использован любой диагностикум, позволяющий определять специфические антитела M и G классов, разрешенный к применению на территории Республики Беларусь. Диагноз основан на обнаружении специфических антител в спинномозговой жидкости и /или сыворотке крови. IgM антитела клещевого энцефалита появляются на 1-6 дней после начала заболевания и, как правило, обнаруживаются при неврологических симптомах.

Специфические антитела класса IgM могут сохраняться до 10 месяцев у лиц, которые инфицировались естественным путем, и у привитых. Специфические антитела класса IgG к вирусу клещевого энцефалита обнаруживаются на 10-14 день от начала клинических проявлений. Высокого уровня они достигают к концу месяца и сохраняются на таком уровне в течение 2-6 месяцев после инфицирования. Через 2-3 года, даже у людей, перенёсших острую форму заболевания, антитела выявляются уже редко. Некоторый процент общей популяции здоровых людей может иметь циркулирующие IgG антитела к вирусу клещевого энцефалита вследствие не имевшего существенных клинических проявлений контакта с вирусом в прошлом. В комплексе с обнаружением IgM антител выявление факта сероконверсии IgG (появление в динамике заболевания специфических антител при их первоначальном отсутствии) говорит в пользу подтверждения клинического диагноза вирусного клещевого энцефалита.

Данные серологического исследования оценивают в комплексе с клиническими и эпидемиологическими критериями, характерными для этого заболевания.

Полимеразная цепная реакция с предварительной обратной транскрипцией (далее – ОТ-ПЦР) является высокочувствительным методом для выявления РНК вируса КЭ в клинических образцах (кровь, ликвор) пациентов, в секционном материале органов умерших людей. Показанием для использования молекулярно-биологических методов исследования являются клинко-эпидемиологические признаки, указывающие на клещевой энцефалит, уточнение диагноза, получение отрицательных результатов при постановке ИФА. Для выявления РНК КЭ в клиническом (плазма крови, ликвор пациентов) и секционном

материале методом ОТ-ПЦР может быть использован любой диагностиком, разрешенный к применению на территории Республики Беларусь. Обнаружение РНК КЭ является доказательством для постановки диагноза – вирусный клещевой энцефалит. Однако, вследствие кратковременной вирусемии и невысокой концентрации вируса в ликворе, отрицательный результат ОТ-ПЦР не исключает клещевой энцефалит при постановке диагноза. Обнаружение вируса КЭ методом ОТ-ПЦР может быть использовано на ранней стадии заболевания для дифференциальной диагностики клещевого энцефалита при микст-инфекции.

4.3. Лабораторная диагностика болезни Лайма

Проводиться согласно Приложению 1 к настоящей Инструкции по применению.

Правильное использование и интерпретация лабораторных тестов требует знания патологического процесса при болезни Лайма и стадии заболевания.

Антитела к боррелиям в сыворотке крови в норме отсутствуют. При болезни Лайма специфические антитела класса IgM обычно появляются в крови через 2-4 недели после заражения, пик синтеза антител приходится на 6-8-ю неделю заболевания. В 1 стадии антитела IgM выявляют у 40-60% пациентов. Таким образом, обследование в течение первых нескольких недель болезни часто даёт отрицательные результаты.

При эффективном лечении IgM должны снижаться или отсутствовать при диагностировании. Ложноположительные результаты определения антител IgM возможны при наличии в крови пациента ревматоидного фактора. У некоторых пациентов содержание IgM остаётся повышенным в течение многих месяцев или появляется вновь в конце заболевания, что свидетельствует о продолжающемся инфицировании и неэффективности антибиотикотерапии. Антитела IgG появляются на 3-6-й

неделе и могут присутствовать в крови от нескольких месяцев до нескольких лет. Титр антител IgG повышается более медленно (через 4-6 нед после эритемы), пик приходится на 4-6-й месяц, титр может оставаться высоким в течение нескольких месяцев или лет, даже на фоне успешного лечения. Почти все пациенты с осложнениями 2-й и 3-й стадий имеют высокий уровень антител IgG. Однократное определение титра антител IgG диагностического значения не имеет, так как может свидетельствовать о ранее перенесённой инфекции. Исследование парных сывороток (острая фаза и выздоровление), взятых с интервалом 4-6 недель, показывающее снижение или нарастание уровня IgG, указывает на выздоровление или наличие болезни Лайма. Ложноположительный низкий титр IgG антител возможен при инфекционном мононуклеозе, сифилисе, ревматических болезнях (СКВ), заболеваниях периодонта, у 5-15% здоровых лиц из эпидемической зоны.

Рекомендуется проведение двухэтапного анализа крови на наличие антител против возбудителя боррелиоза.

На первом этапе используется процедура тестирования под названием ИФА или РНИФ (реакция непрямой иммунофлюоресценции). Если результат отрицательный, никаких дальнейших испытаний не рекомендуется. Если первый шаг положительный или неопределенный (иногда называемый "сомнительный"), должен быть выполнен второй этап. На втором этапе используется метод иммуноблоттинга, обычно, "Вестерн-блот" тест. Результаты считаются положительными, только если ИФА/РНИФ и иммуноблоттинг положительные. Два этапа тестирования болезни Лайма предстоит делать последовательно.

Измененная цереброспинальная жидкость является основным критерием острого нейроборрелиоза. Выявление интратекально продуцированных антител является дополнительным средством

подтверждения диагноза нейроборрелиоза. Для этого в парных сыворотках/ЦСЖ измеряется индекс *Borrelia*-специфичных антител (AI). В зависимости от продолжительности неврологических симптомов, интратекально продуцированные антитела выявляются у 80 – 100% пациентов. Индекс может измеряться даже через несколько лет после проведения эффективной терапии. Кроме того, интратекальный синтез *Borrelia*-специфичных антител является частью полиспецифической реакции у пациентов с множественным склерозом.

Методом ПЦР боррелии определяются в крови через 10 дней после укуса. *Borrelia burgdorferi* (спирохеты) концентрируются в соединительной ткани богатой коллагеном. Несмотря на это, спирохеты могут диссеминировать с места присасывания инфицированного клеща в кровь, однако эта фаза относительно короткая и концентрация спирохет довольно низкая. На самом деле, ПЦР обнаруживает ДНК *Borrelia* в крови меньше чем у половины пациентов в начале острой стадии заболевания, когда присутствует мигрирующая эритема. К тому времени, когда симптомы болезни Лайма присутствуют уже в течение месяца или более, спирохеты в крови не выявляются. *Borrelia burgdorferi* могут быть обнаружены методом ПЦР в образцах биопсии зараженной коже, синовиальной ткани или синовиальной жидкости.

4.4. Лабораторная диагностика смешанных клещевых инфекций

Проводиться в соответствии с критериями диагностики изложенными в Приложении 2 и 3 настоящей Инструкции. Учитывается сочетание:

- эпидемиологических данных – наличие присасывания клеща и его исследование на носительство патогенных для человека микроорганизмов, проживание в эндемичных по клещевому энцефалиту, Лайм боррелиозу и другим клещевым патогенам зоне,

- клинической симптоматики – острое начало заболевания с двухволновой лихорадкой (редко – одноволновая), сочетание мигрирующей эритемы с выраженным общеинфекционным синдромом с артралгиями и поражениями периферической нервной системы,

- серологической диагностики – выявление антител (IgM, IgG) к вирусу КЭ, выявление антител IgM к боррелиям (НРИФ 1:8 и выше) и IgG к боррелиям (НРИФ 1:64 и выше), антител IgG к боррелиям методом иммуноблоттинга, выявление антител (IgM, IgG) к возбудителю ГАЧ методом ИФА, наличие динамики изменения уровня специфических антител (IgM, IgG) при исследовании парных сывороток,

- молекулярно-генетической диагностики – выявление РНК вируса КЭ, ДНК и РНК боррелий или ДНК анаплазмы, в клиническом и полевом материале методом ПЦР.

5. Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении и пути их устранения

К наиболее типичным техническим ошибкам при лабораторной диагностике клещевых смешанных инфекций, приводящим к получению недостоверных результатов, необходимо отнести:

- нарушение правил и сроков забора материала,
- условий хранения и транспортировки,
- нарушение инструкций производителей диагностических препаратов.

Образцы, давшие сомнительный результат подвергаются повторному тестированию с соблюдением всех правил работы.

Приложение 1
к Инструкции по применению
«Клинико-лабораторная
диагностика клещевых микст-
инфекций»

Методы лабораторной диагностики клещевых инфекций и
интерпретация результатов.

Нозология	Метод исследования	Показания	Трактовка результатов
Клещевой энцефалит	1. Реакция иммуноферментного анализа (ИФА) с определением IgM и IgG.	Наличие лихорадки, головной боли, тошноты. Присасывание клеща или употребление козьего молока в эндемичных по КЭ районах и наличие клинических признаков клещевого энцефалита.	Наличие антител класса IgM и/или IgG подтверждает диагноз клещевого энцефалита; отсутствие антител в первые 2 недели полностью не исключает диагноз (в этом случае рекомендуется исследование парных сывороток).
	2. Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) – выявление РНК возбудителя	Клинико-эпидемиологические признаки, указывающие на клещевой энцефалит (для уточнения диагноза и в случаях получения отрицательных результатов ИФА.	Обнаружение РНК возбудителя является доказательством клещевого энцефалита. Однако, отрицательный результат не исключает его (вследствие кратковременной вирусемии и невысокой концентрации вируса в ликворе.

<p>Болезнь Лайма</p>	<p>1. Реакция иммуноферментного анализа (ИФА) или РНИФ, с определением IgM</p> <p>2. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) или ОТ-ПЦР – выявление ДНК/РНК возбудителя</p>	<p>Наличие лихорадки, головной боли, тошноты, эритемы. Присасывание клеща в эндемичных по Лайм боррелиозу районах и наличие клинических признаков.</p> <p>Клинико-эпидемиологические признаки, указывающие на Болезнь Лайма (для уточнения диагноза и в случаях получения отрицательных результатов ИФА или РНИФ).</p>	<p>Наличие антител класса IgM на 2-4 неделе подтверждает диагноз болезни Лайма; отсутствие антител в первые 2-4 недели полностью не исключает диагноз. В этом случае рекомендуется исследование парных сывороток на IgM и IgG, иммуноблот.</p> <p>Обнаружение НК возбудителя является доказательством болезни Лайма. Отрицательный результат не исключает наличия патогена.</p>
----------------------	---	--	---

Приложение 2
к Инструкции по применению
«Клинико-лабораторная
диагностика клещевых микст-
инфекций»

Критерии диагностики клещевых микст-инфекций

Эпиданамнез	<p>– Присасывание клеща при посещении эндемичных по КЭ и ЛБ территорий Республики Беларусь или др. стран</p> <p>– Одновременное или последовательное присасывание двух и более клещей в пределах одного инкубационного периода, употребление козьего молока</p>
Клиника	<ul style="list-style-type: none"> • Острое начало заболевания • Наличие двухволнового характера лихорадки (в редких случаях - одноволновая) • Сочетание мигрирующей эритемы с выраженным общеинфекционным синдромом с артралгиями • Наличие поражений периферической нервной системы • Последовательное появление новых клинических симптомов на фоне имеющихся или их сменяющие
Серологическая диагностика *	<ul style="list-style-type: none"> • Выявление антител (IgM, IgG) к вирусу КЭ • Выявление антител IgM к боррелиям (НРИФ 1:8 и выше) • Выявление антител IgG к боррелиям (НРИФ 1:64 и выше) • Наличие динамики изменения уровня специфических антител (IgM, IgG) при исследовании парных сывороток • Обнаружение антител IgG к боррелиям методом иммуноблоттинга • Обнаружение антител (IgM, IgG) к возбудителю ГАЧ методом ИФА

Молекулярно-генетические исследования	<ul style="list-style-type: none">• Обнаружение РНК вируса КЭ, РНК/ДНК боррелий или ДНК анаплазмы, в клиническом материале и биопробах различными модификациями метода ПЦР
Заключение	<p>* - При положительном результате проводится серологическое подтверждение микст-инфицирования в динамике</p> <p>Отсутствие специфических антител к одной из нозоформ на протяжении 3 мес. исключает диагноз микст-инфекции</p>

Схема диагностики клещевых микст-инфекций



