

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра
Здравоохранения Республики



Д.Л. Пиневиц

2019 г.

Регистрационный № 074-0519

МЕТОД ДИАГНОСТИКИ БОЛЕЗНИ ЛАЙМА И
ПОСТЛАЙМОВСКОГО СИНДРОМА

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ - РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ:

кандидат мед. наук Дракина С.А., Щерба В.В., кандидат мед. наук
Анисько Л.А., Залевская О.С., кандидат мед. наук, доц. Красько А.Г.

Минск. 2019

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра
здравоохранения Республики Беларусь

Д.Л. Пиневиц

28.06.2019

Регистрационный № 074-0519

МЕТОД ДИАГНОСТИКИ БОЛЕЗНИ ЛАЙМА И
ПОСТЛАЙМОВСКОГО СИНДРОМА

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ - РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ:

кандидат мед. наук Дракина С.А., Щерба В.В., кандидат мед. наук
Анисько Л.А., кандидат мед. наук, доц. Красько А.Г., Залевская О.С.

Минск, 2019

В настоящей инструкции по применению (далее - инструкция) изложены клинические и лабораторные критерии диагностики болезни Лайма с поражением нервной системы и постлаймовского синдрома, показания для лабораторных исследований, алгоритм лабораторной диагностики, а также принципы интерпретации получаемых результатов, что позволит оптимизировать лабораторную диагностику данного заболевания, сократить сроки установления диагноза, адекватно и своевременно назначить этиотропную терапию. Инструкция может быть использована в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику инфекций, переносимых клещами.

Предназначена для врачей-неврологов, врачей-инфекционистов и иных специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с клещевыми инфекциями в амбулаторных и (или) стационарных условиях, и(или) осуществляющих государственный санитарный надзор.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. Показания к применению

Инструкция может быть использована в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику инфекций, переносимых клещами, и эпидемиологическом надзоре клещевых инфекций; в частности - для диагностики болезни Лайма с поражением нервной системы и постлаймовского синдрома.

2. Противопоказания

Противопоказания для применения метода отсутствуют.

3. Перечень медицинских изделий, лекарственных средств, реактивов и т.д.

3.1. Медицинская техника:

люминисцентный микроскоп;

магнитная мешалка;

термостат на 37°C;
промывочное устройство;
спектрофотометр;
термоциклер с оптической системой детекции;
центрифуга на 14000 об/мин. с охлаждением;
ПЦР боксы;
вортекс;
твердотельный термостат;
шейкер (с низкой скоростью покачивания);
морозильник с температурой (-20°C).

3.2. Медицинские изделия:

планшет для иммунологических исследований;
градуированные пипетки с наконечниками на 0,5-10 мкл, 10-100 мкл,
100-1000 мкл, 1000-5000мкл;
пробирки пластиковые типа «Эппендорф» (1,5 мл, 0,2 мл, 2 мл);
градуированные цилиндры, колбы на 100мл, пенициллиновые
флаконы;
штативы для пробирок.

3.3. Материалы для сбора клинических образцов:

пробирки герметичные с крышками на 1, 5мл, 15 мл и 50 мл для забора
проб биологического материала и вакутайнеры с ЭДТА с переходником для
забора крови;

транспортировочные контейнеры для упаковки и транспортировки
проб в соответствии с условиями работы с патогенными биологическими
агентами (ПБА) 3 группы биологического риска.

3.4. Реагенты для проведения исследований:

тест-система для выявления суммарных антител к возбудителю
болезни Лайма методом непрямой иммунофлюоресценции (нРИФ)
«НИФМ-ЛАЙМ-АТ»;

тест-система диагностическая для выявления антител к *Borrelia burgdoferi s.l.* методом иммуноферментного анализа (ИФА) «ИФА-Лайм-IgG»;

тест-система диагностическая для выявления антител к *Borrelia burgdoferi s.l.* методом иммуноблоттинга (ИБ) «Лайм-блот IgM»;

тест-система диагностическая для выявления антител к *Borrelia burgdoferi s.l.* методом ИБ «Лайм-блот IgG»;

тест-система иммуноферментная для определения уровня цитокина CXCL13 в крови и ликворе;

комплект реагентов для выделения ДНК из проб биологического материала любого производителя;

тест-системы для выявления и идентификации ДНК боррелий методом ПЦР в режиме реального времени.

4. Описание алгоритма, используемого для диагностики болезни Лайма с поражением нервной системы и постлаймовского синдрома.

4.1. Отбор пациентов с неврологическими нарушениями для исследований

При поступлении пациента с неврологическими нарушениями (серозный менингит, парез лицевого нерва одно- или двусторонний, менингоэнцефалит, энцефалит, энцефаломиелит) устанавливаются сроки заболевания и эпидемиологический анамнез. Если пациент отрицает укусы клеща, но пребывал за городом (дача, сбор ягод или грибов, прогулки в лесной зоне, туризм), он, тем не менее, подлежит обследованию на клещевые инфекции и, в частности, на болезнь Лайма. В таблице 1 указаны клинические критерии, по которым пациент должен быть обследован на нейроборрелиоз.

Таблица 1 - Критерии клинической диагностики нейроборрелиоза и постлаймовского синдрома

Ранний нейроборрелиоз (до полугода после укуса клеща)	<ul style="list-style-type: none"> – Острое начало заболевания – Мигрирующая эритема в анамнезе – Наличие поражений периферической нервной системы (радикулопатии, синдром Баннварта)
Поздний нейроборрелиоз	<ul style="list-style-type: none"> – Появление неврологической симптоматики спустя год и более после укуса) – Прогрессирование в виде энцефаломиелита, подострой энцефалопатии, радикулопатий, синдрома паркинсонизма, васкулита головного мозга, болезни моторного нейрона
Постлаймовский синдром	<ul style="list-style-type: none"> – Сформировавшаяся клиническая картина в раннем периоде заболевания без последующего прогрессирования

Примечание: при поступлении пациента в ранней стадии заболевания необходимо обследование на клещевой энцефалит для исключения клещевого энцефалита и микст-инфекции методом иммуноферментного анализа (ИФА) с определением IgM и IgG

4.2. Правила получения, транспортировки и хранения биологического материала для исследований

Забор биологического материала следует производить с соблюдением правил работы с ПБА 3 группы риска в соответствии с СанНиП «Требования безопасности при осуществлении работ с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению их учета, хранения, передачи и транспортировки», утверждёнными постановлением Министерства Здравоохранения Республики Беларусь 6 января 2017 г., № 2.

4.2.1. Забор биологического материала – кровь пациентов

Забор крови для проведения серологического исследования осуществляется в первые дни заболевания и затем в динамике в зависимости

от особенностей иммунного ответа. Забор крови для проведения молекулярно-биологического исследования осуществляется в максимально ранние сроки заболевания вплоть до 7 дня с момента появления первых признаков инфекции.

Взятие крови следует производить натошак или через 3 часа после приема пищи из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8-1,1 мм) в вакутайнер. После взятия крови пробирку следует плавно несколько раз перевернуть вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом. (NB! В противном случае кровь свернется и выделение ДНК/РНК станет невозможным!). После плавного перемешивания пробирку поместить в штатив.

4.2.2. Получение биологического материала – плазмы крови.

Плазму крови получают путем центрифугирования пробирки с цельной кровью в течение 10-20 минут при 3000 об/мин, после чего плазму отбирают наконечниками (на 1 мл) с аэрозольным барьером и переносят в пробирки типа «эппендорф». Образцы плазмы крови желательно разлить небольшими (0,1-0,2 мл) порциями в отдельные стерильные пробирки объемом 1,5 мл. Образцы, предназначенные для длительного хранения, отбирают в пробирки на 2 мл с завинчивающимися крышками. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

4.2.3. Хранение биологического материала.

Условия хранения материала:

- образцы цельной крови: при температуре от 20°C до 25°C – в течение 6 часов с момента получения материала; при температуре от 2°C до 8°C – не более одних суток;

- образцы плазмы крови: при температуре от 2°C до 8°C – не более 4-6 дней, при (-20°C) до 6 месяцев, до года и более при (-70°C)..

Недопустимо замораживание образцов цельной крови!

4.2.4. Транспортирование биологического материала.

Транспортирование пробирок с кровью и микропробирок с плазмой осуществляют в специальном термоконтейнере с охлаждающим элементом или в термосе со льдом при температуре плюс от 2°C до 8°C. Каждый образец для исключения взаимной контаминации хранят и транспортируют в отдельном полиэтиленовом пакете.

Внимание!!! При наличии неврологической симптоматики, указывающей на поражение ЦНС возбудителями клещевых инфекций, показан забор спинномозговой жидкости в стерильные пластиковые пробирки.

Транспортирование и хранение пробирок с ликвором осуществляют по тем же требованиям, что и образцы крови и плазмы.

4.3. Алгоритм клинико-лабораторной диагностики болезни Лайма с поражением нервной системы (нейроборрелиоз) и постлаймовским синдромом.

Диагностика болезни Лайма с поражением нервной системы (нейроборрелиоза) состоит из 2 этапов: 1 – исследование сыворотки крови на подтверждение/выявление возбудителя болезни Лайма (нРИФ, ИФА, ИБ): 2 – исследование ЦСЖ на доказательство поражения нервной системы *Borrelia burgdoferi s.l.* (ПЦР. наличие интратекальных антител, высокий уровень содержания цитокина CXCL13).

Ниже представлен алгоритм диагностики нейроборрелиоза (Рис. 1). нРИФ и ИФА являются скрининговыми реакциями при диагностике болезни Лайма. Титр антител IgM 1:16 и выше и/или IgG 1:64 и выше в нРИФ, а также нарастание титра антител в динамике в 4 раза и более в парных сыворотках, взятых с интервалом 14 дней либо обнаружение антител к ЛБ в ИФА, предполагает боррелиозную этиологию процесса. Результаты исследований методами нРИФ или ИФА должны быть подтверждены в иммуноблоттинге по рекомендациям ВОЗ (2-ступенчатая диагностика ЛБ), т.к. последний является высокоспецифичным тестом.

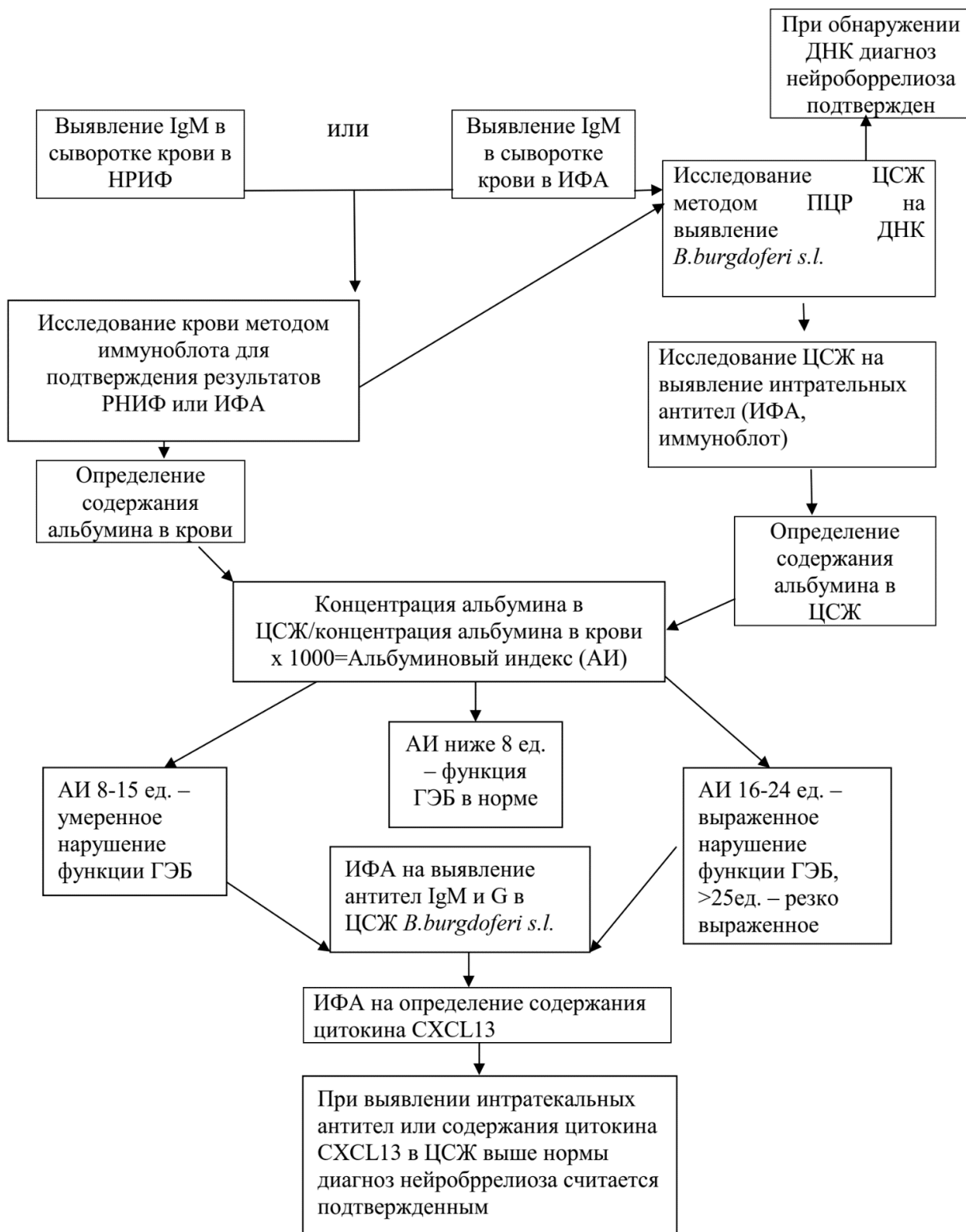


Рисунок 1 -Алгоритм лабораторной диагностики болезни Лайма с неврологическими проявлениями и постлаймовского синдрома

Положительные результаты в ИБ на наличие IgM указывают на раннюю диссеминированную стадию и достоверность полученных результатов в нРИФ или ИФА. Подтверждение в ИБ IgG в титрах разведения сыворотки 1:64 и выше указывает на позднюю стадию заболевания.

Наряду с исследованием крови при подозрении на нейроборрелиоз параллельно проводится исследование ликвора. При обнаружении ДНК *Borrelia burgdoferi s.l.* диагноз НБ считается достоверным и дальнейших исследований проводить нет необходимости. Однако отрицательный результат ПЦР не исключает поражения нервной системы, вызванных *Borrelia burgdoferi s.l.*, вследствие невысокой чувствительности метода при локализованных поражениях. При отрицательных результатах ПЦР для подтверждения НБ предлагается проводить выявление интратекальных антител (ИТА) IgM и IgG к *Borrelia burgdoferi s.l.* в ликворе. Их наличие в ликворе указывает на присутствие боррелий в ЦНС. Для определения интратекальных антител используются методы ИФА и/или иммуноблоттинг. Наряду с этим проводятся исследования на функциональную целостность гематоэнцефалитического барьера (ГЭБ). При нарушении функционального состояния ГЭБ диагноз НБ ставится под сомнение, несмотря на наличие антител в ЦСЖ. Вместе с тем нужно отметить, что из-за особенностей иммуногенеза в ЦНС продукция антител незначительна и методы ИФА и ИБ, несмотря на их высокую специфичность, обладают в данном случае невысокой чувствительностью. При отрицательных результатах на наличие ИТА проводится исследование ликвора на содержание цитокина CXCL13 с использованием тест-системы ИФ, высокое содержание которого является специфичным для НБ и служит косвенным доказательством присутствия *Borrelia burgdoferi s.l.* и подтверждает диагноз НБ.

5. Учёт результатов

1. При обнаружении ДНК *Borrelia burgdoferi s.l.* диагноз НБ считается достоверным и дальнейших исследований проводить нет необходимости.

2. Наличие ИТ в ликворе указывает на присутствие боррелий в ЦНС. При нарушении функционального состояния ГЭБ диагноз НБ ставится под сомнение, несмотря на наличие антител в ЦСЖ.

3. Высокое содержание цитокина CXCL13 является специфичным для НБ и служит косвенным доказательством присутствия *Borrelia burgdoferi s.l.* и подтверждает диагноз НБ.

6. Перечень возможных ошибок, ограничений и пути их устранения

В таблице 2 представлены проблемы и методические ошибки, которые могут возникать при выполнении метода ПЦР с описанием причин возникновения и путей их устранения.

Таблица 2 Возможные ошибки или осложнения при выполнении метода и пути их устранения

Проблема	Возможная причина	Пути устранения
Низкие значения флюоресценции и при диагностической амплификации.	Деградация ДНК и/или низкое содержание исходной ДНК	Использовать только свежие образцы биологического материала для выделения ДНК.
	Деградация ДНК	Использовать пробы ДНК сразу после выделения. Контроль качества наборов для выделения ДНК, согласно инструкции производителя.
Отсутствие ПЦР-продуктов при электрофоретической детекции	Погрешности в проведении реакции амплификации	Контроль качества реагентов путём использования в реакции контрольных образцов.