

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра
здравоохранения,
Главный государственный
санитарный врач

_____ М.И. Римжа
21 января 2008 г.
Регистрационный № 136-1207

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА БОЛЕЗНИ ЛАЙМА

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии», ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья»

АВТОРЫ: канд. мед. наук А.С. Петкевич, д-р мед. наук, проф., чл.-кор. НАНБ Л.П. Титов, Н.И. Ерофеева, Н.С. Верещако, С.Ф. Семенов, А.Л. Веденьков, С.Е. Яшкова

Минск 2008

Настоящая инструкция «Лабораторная диагностика болезни Лайма» (далее – инструкция) включает методы лабораторной диагностики боррелиозной инфекции, позволяющие определять естественную зараженность переносчиков возбудителя заболевания и выявлять специфические антитела в сыворотке крови людей.

Инструкция предназначена для специалистов лабораторий санитарно-эпидемиологической службы и лечебно-профилактических организаций, занимающихся диагностикой болезни Лайма (БЛ).

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Болезнь Лайма – природно-очаговое трансмиссивное инфекционное заболевание, широко распространенное в странах умеренного климатического пояса. БЛ характеризуется полиморфизмом клинических проявлений, способностью протекать в латентной форме и принимать хроническое течение с длительной утратой трудоспособности, массовостью ежегодных новых случаев инфекции.

Возбудители заболевания – спирохеты *Borrelia burgdorferi sensu lato* – передаются человеку иксодовыми клещами. Основным переносчиком боррелиозной инфекции в республике является клещ *Ixodes ricinus* – доминирующий вид в сборах с природы. Роль другого по численности представителя иксодид – *Dermacentor reticulatus* – менее существенна. Основные хозяева возбудителя БЛ в природных очагах – мышевидные грызуны.

МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ БОЛЕЗНИ ЛАЙМА

Диагностика болезни Лайма основана на микроскопических и серологических методах исследования.

Микроскопические исследования позволяют обнаруживать боррелии в иксодовых клещах. Определение спонтанной инфицированности переносчиков проводят с помощью традиционных методов темно- и светлопольной микроскопии.

Серологические методы выявляют наличие и концентрацию специфических антител в сыворотке крови больного. Наиболее широко используются непрямая реакция иммунофлюоресценции (НРИФ) и иммуноферментный анализ (ИФА).

Определенную диагностическую значимость имеет обнаружение антигена возбудителя в иксодовых клещах непрямым иммунофлюоресцентным методом.

МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Методы микроскопии основаны на определении специфической морфологии возбудителя. Проводят микроскопию как витальных препаратов в темном поле, так и фиксированных окрашенных мазков в световом микроскопе. Простота приготовления витальных препаратов позволяет сравнительно быстро исследовать массовые сборы клещей. Преимущество фиксированных мазков

заключается в том, что они могут длительно храниться и просматриваться в удобное для исследования время.

Объектом исследования служит кишечник живых голодных переносчиков на стадиях нимфы и имаго.

Темнопольная микроскопия витальных препаратов

Приготовление препаратов: на предметное стекло наносят каплю физиологического раствора объемом 10 мкл, в которую помещают исследуемую особь брюшной стороной вверх. Придерживая клеща пинцетом, препаровальной иглой делают несколько продольных надразов, отсекающих идиосому клеща таким образом, чтобы содержимое внутренних органов попало в каплю физиологического раствора. Полученный материал представляет собой взвесь, состоящую в основном из обрывков эпителия дивертикул кишечника, где также могут находиться фрагменты мальпигиевых сосудов, гонад, слюнных желез и др. Взвесь тщательно ресуспендируют микропипеткой и переносят на другое чистое, хорошо обезжиренное предметное стекло толщиной 1,0-1,2 мм, накрывают покровным стеклом толщиной 0,2 мм и немедленно, во избежание подсыхания, приступают к просмотру.

Просмотр препаратов. Для этой цели используют микроскоп с конденсором темного поля (например, ОИ-13) и осветителем ОИ-19 или другой системы, объективы – х10 и х40, окуляры – х10. Оптимальной является система с общим увеличением х600-х700.

На верхнюю линзу конденсора наносят каплю дистиллированной воды и помещают препарат на предметный столик микроскопа таким образом, чтобы он соприкасался с нанесенной каплей. Используя объектив с небольшим увеличением (х10), с помощью фокусировочных винтов добиваются появления в поле зрения четкого изображения, после чего осуществляют предварительный просмотр препарата. Установив объектив х40, переходят к более детальному исследованию объекта.

Всю площадь препарата исследуют равномерно, просматривая параллельными рядами до 200 полей зрения (10 рядов по 20 полей зрения в каждом). Обычно в препаратах сильно- и среднеинфицированных клещей обнаружить спирохеты удастся довольно быстро, просмотрев не более 50-100 полей зрения. Но чаще всего степень зараженности клещей боррелиями бывает невысокой, и выявление спирохет обычно требует большего объема работы. Просматривая препарат, можно обнаружить как единичные микробные клетки, так и скопления боррелий в виде кос, клубков. Отрицательным считается препарат, если при просмотре не менее 200 полей зрения боррелии обнаружены не были.

Светлопольная микроскопия фиксированных окрашенных препаратов

Приготовление мазка: у взрослого клеща, удерживаемого пинцетом, срезают тонкий слой заднего края тела. Легким скользящим движением проводят срезом по предметному стеклу, оставляя мазок длиной 2,5-3,0 см. Рекомендуется иметь по два мазка от каждой исследуемой особи, что повышает вероятность обнаружения боррелий. Затем препарат подсушивают на воздухе.

Для приготовления препарата из нимфы или личинки у исследуемой особи при помощи препаровальной иглы нарушают целостность хитинового покрова и, удерживая ее пинцетом, проводят по поверхности предметного стекла. Обычно удается сделать лишь один мазок. Препарат подсушивают на воздухе.

Фиксация препарата. Самый простой и распространенный способ – фиксация в пламени спиртовки. Удерживая стекло мазком вверх, его трижды проводят над пламенем спиртовой горелки. Чтобы не перегреть препарат, время фиксации не должно превышать 5-6 с, а прямое воздействие пламени – 2 с. В этом случае мазок будет хорошо держаться на стекле. Фиксированные препараты могут длительное время храниться в сухом месте при комнатной температуре.

Перед проведением микроскопических исследований препарат окрашивают по методу Романовского – Гимза. Для этого фиксированный мазок выдерживают в течение 40-60 мин в 5% растворе красителя Гимзы, прополаскивают водой, высушивают при комнатной температуре. Для более полного прокрашивания боррелий необходимо докрасить препарат раствором кристаллического фиолетового, который готовят следующим образом: 2 г краски растворяют в 20 мл этилового спирта и смешивают с 80 мл оксалата аммония (натрия или калия). Готовый краситель хранится при комнатной температуре в темноте в течение года. Раствор кристаллического фиолетового наносят на мазок, выдерживают 10-30 мин, затем слегка ополаскивают водой, высушивают.

Препарат микроскопируют сразу же или в течение 2-3 недель, сохраняя его в темноте, так как окрашенный препарат довольно быстро выцветает. В последнем случае возможна повторная покраска указанным выше способом.

Исследуют препарат в микроскопе со светлупольным конденсором под масляной иммерсией, используя осветитель типа ОИ-19 или другой системы, объективы $\times 90$ или $\times 100$. Оптимальное увеличение – $\times 600$ - $\times 700$. Просматривают периферические участки мазка, содержащие не более одного слоя клеток. Исследуют не менее 100-150 полей зрения, что гарантирует большую вероятность обнаружения боррелий.

Возможные проблемы при проведении микроскопических исследований и меры их устранения:

- наличие в препарате образований, по морфологии отдаленно напоминающих боррелии. Меры устранения: четкое знание особенностей морфологии боррелий, позволяющее отличить их от других объектов;

- посторонние образования в виде полос, штрихов, густых пятен в поле зрения микроскопа, мешающие просмотру препаратов. Меры устранения: использование качественных (без дефектов и царапин), чистых и хорошо обезжиренных предметных стекол;

- при исследовании препаратов в темном поле не просматриваются или не четко видны пассивно и активно двигающиеся частицы. Меры устранения: правильная регулировка освещения и настройка микроскопа согласно инструкции по эксплуатации;

- недостаточный прокрас мазков при светлопольной микроскопии. Меры устранения: правильное приготовление растворов красителей, строгое соблюдение временного режима окраски. Проведение повторной окраски препарата.

СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основными серологическими методами лабораторной диагностики болезни Лайма являются непрямая реакция иммунофлюоресценции и иммуноферментный анализ. Подтверждение боррелиозной инфекции осуществляется преимущественно с помощью диагностических препаратов, разработанных в ГУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии» на основе отечественных штаммов возбудителя, позволяющих определять антитела в сыворотках крови людей, а также выявлять антиген возбудителя Лайм-боррелиоза в переносчиках серологическими тестами.

Постановка диагноза БЛ основывается на характерной для данного заболевания клинической симптоматике с учетом эпидемиологических факторов (присасывание клещей, сезонность) и подтверждается определением специфических иммуноглобулинов в сыворотке крови больных. Уровень антител повышается достаточно медленно, что является особенностью боррелиозной инфекции. Антитела обнаруживаются на 3-6 неделе после заражения и позже, поэтому на ранних стадиях болезни часто регистрируются ложноотрицательные результаты. Пациенты с хроническим течением заболевания являются серопозитивными в 100% случаев.

Выявление антигена возбудителя в иксодовых клещах в НРИФ

Определение естественной инфицированности иксодовых клещей возбудителем БЛ преимущественно осуществляют методом непрямо́й иммунофлюоресценции. Этот тест отличается более высокой эффективностью в сравнении с традиционными методами микроскопии.

Исследование клещей проводят с использованием «наборов иммунофлюоресцентных для выявления антигена возбудителя болезни Лайма в переносчиках» по ТУ РБ 100558032.086-2002 производства ГУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии». Аналоги данного диагностического препарата не известны. Принцип действия набора основан на специфическом взаимодействии антител иммунной сыворотки с антигеном возбудителя в исследуемой пробе. Иммунный комплекс антиген-антитело выявляют с помощью конъюгата, меченого флюоресцеинизотиоцианатом.

Исследованию подлежат иксодовые клещи всех стадий развития (личинки, нимфы, имаго), в любом физиологическом состоянии: голодные, напитавшиеся, живые, погибшие, высохшие, фрагменты клещей (часть брюшка). Погибшие и высохшие переносчики без признаков плесени могут быть исследованы в течение 2-х месяцев со дня сбора.

Постановку НРИФ, регистрацию и оценку результатов осуществляют согласно прилагаемой к тест-системе инструкции по применению.

Возможные проблемы при прохождении НРИФ и меры их устранения:

- в лунках с положительным контролем отсутствует специфическое свечение антигена либо наблюдается свечение недостаточной интенсивности. Меры устранения: строгое соблюдение температурного режима хранения ингредиентов набора. Недопущение многократного их замораживания и оттаивания;

- образование многослойных препаратов, что затрудняет или делает невозможным их просмотр. Меры устранения: во избежание приготовления слишком густой клещевой суспензии следует соразмерять объем капли цитратно-фосфатного буферного раствора (ЦФБ) с размером клеща, руководствуясь инструкцией по применению. Строгое соблюдение временного режима отмывки препаратов при постановке реакции.

Выявление антител в сыворотках крови в НРИФ

Исследования проводят с использованием «тест-систем для выявления антител к возбудителю Лайм-боррелиоза иммунофлюоресцентных» по ТУ РБ 100558032.084-2002 производства ГУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии» или др. Принцип действия тест-системы основан на образовании специфических иммунных комплексов между антигеном, иммобилизированным на поверхности лунок предметных стекол, и антителами исследуемой сыворотки крови. Иммунный комплекс антиген-антитело выявляют с помощью конъюгата, меченного флюоресцеинизотиоцианатом.

Получение, обработка и приготовление проб для НРИФ

Взятие крови на исследование рекомендуется осуществлять в первые дни инфицирования и через 3-6 недель от начала заболевания. Двукратное и большее нарастание титров антител при одновременном исследовании парных сывороток считают достаточным для подтверждения клинического диагноза. При верификации клинических случаев поздних стадий болезни решающее значение имеет выявление диагностически значимых титров антител. Кровь, поступающую на исследование, выдерживают в термостате при 37°C в течение 30 мин для скорейшего сворачивания. Центрифугируют при 1000-1500 об./мин в течение 15 мин, отбирают сыворотку в пластиковую пробирку в объеме 0,5-1,5 мл. Полученную сыворотку исследуют либо хранят при -20°C до проведения тестирования. Многократные замораживания и оттаивания образцов нежелательны, так как антитела при этом могут разрушаться. Перед постановкой опыта готовят двукратные разведения исследуемых проб, начиная с 1:32, на рабочем растворе, приготовленном из концентрата ЦФБ, в соответствии с указанием инструкции по применению.

Постановку НРИФ, регистрацию и оценку результатов осуществляют согласно прилагаемой к тест-системе инструкции по применению.

Возможные проблемы при постановке НРИФ и меры их устранения:

- в лунках с положительным контролем отсутствует специфическое свечение антигена либо наблюдается свечение недостаточной интенсивности. Меры устранения: строгое соблюдение температурного режима хранения ингредиентов тест-системы. Недопущение многократного их замораживания и оттаивания;

- фоновое окрашивание после нанесения диагностической флюоресцирующей сыворотки, затрудняющее интерпретацию результатов. Меры устранения: строгое соблюдение временного режима стадии отмывки;

- редкое расположение антигена (единичные микробные клетки в поле зрения) в лунках с положительным контролем. Меры устранения: строгое соблюдение временного режима стадии отмывки.

Выявление антител в сыворотках крови методом ИФА

Исследования проводят с использованием «тест-систем иммуноферментных для выявления антител к возбудителям болезни Лайма» по ТУ РБ 100558032.060-2000 производства ГУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии» или др. Принцип действия тест-системы основан на способности выявлять антитела к возбудителю Лайм-боррелиоза в сыворотках крови людей за счет их взаимодействия с иммобилизованным на поверхности лунок планшет антигеном возбудителя БЛ. Образованный комплекс антиген-антитело выявляют с помощью иммунопероксидазного конъюгата.

Обработка проб для постановки ИФА

Кровь, поступающую на исследование, выдерживают в термостате при 37°C в течение 30 мин для скорейшего сворачивания. Центрифугируют при 1000-1500 об./мин в течение 15 мин, отбирают сыворотку в пластиковую пробирку в объеме 0,5-1,5 мл. Полученную сыворотку исследуют либо хранят при -20°C до проведения тестирования. Многократные замораживания и оттаивания образцов нежелательны, так как антитела при этом могут разрушаться.

Постановку ИФА, регистрацию и оценку результатов осуществляют согласно прилагаемой к тест-системе инструкции по применению.

Возможные проблемы при постановке ИФА и меры их устранения:

- показатели оптической плотности положительного, отрицательного контролей и калибровочного стандарта не соответствуют установленным пороговым уровням. Меры устранения: строгое соблюдение температурного и временного режимов прохождения реакции;

- не возникает окраса после добавления субстрат-индикаторного раствора. Меры устранения: слежение за правильным приготовлением субстрат-индикаторного раствора (полным растворением его компонентов и соответствием рН полученного раствора параметрам, указанным в инструкции по применению), строгое соблюдение температурного и временного режимов прохождения реакции.