Федеральное бюджетное учреждение науки

«Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора

**Информационно-методическое письмо**

**«Применение различных лабораторных методов для диагностики иксодовых клещевых боррелиозов»**

Иксодовые клещевые боррелиозы - группа трансмиссивных инфекционных заболеваний с природной очаговостью, вызываемых спирохетами из рода Borrelia. Клинически характеризуются циклическим рецидивирующим течением, типичными, но не обязательными, кожными проявлениями и возможным последовательным вовлечением в патологический процесс нервной системы, сердца, суставов.

Возбудители ИКБ относятся к порядку Spirochaetales, семейству Spirochaetaceae, роду Borrelia. Все известные виды рода Borrelia сходны морфологически, это грамотрицательные спирохеты, окрашивающиеся анилиновыми красителями, что отличает их от других родов спирохет. В настоящее время различают 13 геновидов боррелий, относящихся к этому комплексу. На территории России доказано распространение 3 геновидов, патогенных для человека: *B.afzelii*, *B.garinii,* *B.miyamotoi,* а также *Borrelia burgdorferi s.s.*, циркуляция которых была обнаружена в Америке, а затем и в Европе.

С начала официальной регистрации данной инфекции в 1992 г. в РФ наблюдался непрерывный рост заболеваемости, связанный в том числе и с улучшением диагностики ИКБ. По данным официальной регистрации среднемноголетний показатель заболеваемости ИКБ в Российской Федерации составляет 4,40 на 100 тысяч населения, в Сибирском Федеральном округе этот показатель в два раза выше – 10,08. В настоящее время регистрируемая заболеваемость клещевыми боррелиозами в Российской Федерации достигла уровня заболеваемости КЭ. Выраженная тенденция к увеличению зарегистрированных случаев ИКБ в России в целом обусловлена не только реальным ростом заболеваемости, но и большим вниманием к этой инфекции и совершенствованием ее диагностики.

**Клинико-эпидемиологическая диагностика**

Клинический диагноз острого периода при наличии характерной мигрирующей эритемы не представляет больших трудностей. Важным моментом является приуроченность эритемы к месту бывшего присасывания клеща. Характерная особенность ИКБ у детей - преимущественная локализация входных ворот на волосистой части головы, ушных раковинах, шее, в то время как у взрослых - туловище и конечности. Первоначально на месте присасывания клеща обнаруживается пятно, либо папула диаметром до 5 мм, иногда с пузырьковыми элементами и некрозом. Эритема, распространяясь центробежно, увеличивается в размерах, приобретает кольцевидную форму или имеет вид сплошного пятна. Учитывается и то обстоятельство, что эритема - довольно длительный признак (в среднем 4 недели) и быстро регрессирует только под воздействием антибактериальной терапии, а, исчезая, может оставлять в центре шелушение либо пигментированное пятно. Эритема у половины пациентов сопровождается отеком, который особенно заметен на лице, и часто сопровождается неприятными ощущениями в виде боли, зуда и жжения. Следует обратить внимание на нередкую сочетанность эритемы с регионарным лимфаденитом.

Появление эритемы сопровождается у части больных симптомами интоксикации, которая не обязательна, а при ее наличии чаще всего слабо или умеренно выражена. В случаях, протекающих с МЭ, даже отрицание пациентом факта присасывания клеща при определенных обстоятельствах (например, контакт с очагом) не является препятствием для постановки диагноза ИКБ, а локализация эритемы помогает уточнить место входных ворот.

В отличие от эритемных безэритемные формы острого периода содержат достаточно большие диагностические трудности. Здесь в качестве важных опорных признаков выступают эпидемиологические моменты. Факт нападения клеща, к сожалению, не всегда фиксируется даже взрослым больным. Поэтому большое значение приобретает выяснение обстоятельств вероятного контакта с клещами (посещение леса в период активности клещей (возможный их занос с одеждой другими лицами, букетами цветов, животными, особенно собаками и пр.). Необходимо учитывать и то обстоятельство, что даже множественное в течение сезона присасывание клещей, как и ответная лихорадка больного, сами по себе не являются безусловными в диагностике ИКБ. Неопределенность безэритемной формы острого периода (занимающей по данным ряда авторов до 40%) требует лабораторного подтверждения.

Вышеописанные проявления острого периода могут в определенной своей части сочетаться с признаками диссеминации процесса: кардиопатиями, инъекцией сосудов глаз, конъюнктивитом, гепатомегалией, общемозговыми симптомами и серозным менингитом.

В стадии ранней диссеминации правильная диагностика облегчается при наличии у определенной части больных (3-20%) вторичных эритем, локализация которых не связана с местом бывшего присасывания клеща. Обычно они манифестируют на 2-3-й неделе заболевания, разных размеров и по количеству - от единичных до десятков. Помогает диагностике и сочетанность вторичных эритем с температурной реакцией и другими признаками интоксикации, а также сравнительно частыми поражениями других органов и систем, например, нервной. Необходимо учитывать, что вторичным эритемам не всегда предшествуют первичные и иногда дебют болезни связан только с их появлением. Особые диагностические трудности на стадии ранней и генерализованной диссеминации представляют более частые в этих случаях безэритемные формы. Тщательный эпидемиологический анамнез, выяснение ретроспективы заболевания с учетом полиморфизма и смены одного симптомокомплекса другим позволяет правильно сделать вывод о возможном иксодовом клещевом боррелиозе, требующего своего лабораторного подтверждения.

**Биохимическая характеристика воспалительного процесса и нарушение гемостаза при ИКБ.**

В разгар заболевания отмечается повышение С-реактивного белка, сиаловых кислот, серомукоида. У пациентов с моноинфекцией ИКБ к 3-й неделе сохраняются высокие значения С-реактивного белка и серомукоида. Это свидетельствует об однозначной воспалительной реакции при ИКБ. Отмечено повышение уровня α1-глобулинов в острый период ИКБ. Дефицит ɤ-глобулинов свидетельствует о риске развития хронической инфекции. К 3-й неделе заболевания выявляется достоверное повышение уровня ɤ -глобулинов.

Боррелиоз, вызванный *B. miyamotoi*, протекает с более выраженной интоксикацией, чем ИКБ в эритемной форме — лихорадка при этом заболевании выше и продолжительнее. Имеются так же и принципиальные отличия в патогенезе между этими заболеваниями — так боррелиоз, вызванный *В.miyamotoi*, характеризуется выраженной бактериемией, тогда как при ИКБ в эритемной форме возбудитель локализован в коже (в окрестности входных ворот). Возможно, что именно клинико-патогенетические отличия боррелиоза, вызванного *В.miyamotoi* — бактериемия и интоксикация — являются основой поражения почек при этом заболевании.

В основе патогенеза ренальных дисфункций лежит прямое либо опосредованное через систему иммунной защиты боррелий-индуцированное повреждение эндотелия (в том числе сосудистого клубочка) с последующей активацией сосудисто-тромбоцитарного гемостаза и тромбоцитопенией. Как известно, боррелии не имеют и не способны продуцировать эндотоксин; пирогенном этих микроорганизмов, оказывающим подобное действие являются липопротеиды наружной оболочки, именно они инициируют высвобождение макрофагами провоспалительных цитокинов, которые в свою очередь могут повреждать эндотелий и активизировать тромбоциты. В результате выраженной активации и агрегации тромбоцитов наступают микротромбирование микроциркуляторного русла, динамические нарушения кровоснабжения паренхимы почек, повреждение мембраны сосудистого клубочка с нарушение образования первичной мочи в отдельных нефронах. Как следствие указанных нарушений, явились регистрируемая у больных микроальбуминурия и протеинурия, увеличение уровня Д-димеров, увеличение отношения альбумины мочи/креатинин мочи, уменьшение скорости клубочковой фильтрации (СКФ) и резерва клубочковой фильтрации (РКФ).

Выявление увеличения концентрации цистантина С сыворотки при ИКБ, вызванном В. miyamotoi, подтверждает наличие клубочковой дисфункции в разгаре болезни. Чувствительность данного маркера в определении острой почечной недостаточности (ОПН) превосходит чувствительность содержания сывороточного креатинина и клиренса эндогенного креатинина. Напрямую с течением ИКБ, вызванного *В. miyamotoi*, можно связать 77% случаев ОПН, диагностированной за счет увеличения цистантина С сыворотки, этот показатель требует дальнейшего изучения и исключения возникновения хронической клубочковой патологии после ИКБ, вызванного В. miyamotoi.

При инфицировании *В. miyamotoi* происходит нарушение целостности эндотелия сосудов в микроциркуляторном русле, активация сосудисто-трмбоцитарного звена гемостаза, нарушение физиологической функции органа. Маркерами неполноценности эндотелия и активации сосудисто-тромбоцитарного гемостаза являются: повышение содержания в плазме фактора Виллебранда; повышение содержания в плазме свободного ТПА (тканевого активатора плазминогена; определение спонтанной и стимулируемой агрегации тромбоцитов; количество тромбоцитов в периферической крови.

**Лабораторная диагностика**

Лабораторная диагностика боррелиозной инфекции включает в себя ряд тестов, как прямых (микроскопический, культуральный и ПЦР методы), так и непрямых – серологических (иммунофлуоресцентный, иммуноферментный, иммунный блотинг) методов. Материалом длясерологического и молекулярно-биологического исследования являются кровь, плазма, сыворотка крови, спинномозговая жидкость больных, биоптат кожи, пунктат лимфатических узлов, синовиальная жидкость, иксодовые клещи.

1. **Прямые микроскопические методы** исследований позволяют обнаружить боррелии в различных материалах: спинно-мозговая жидкость, кровь, синовиальная жидкость, биоптаты тканей. Микроскопические методы позволяют определить морфологию возбудителя, но не его свойства. При микроскопии биоптатов тканей используется метод импрегнации серебром. Может использоваться электронная или флуоресцентная микроскопия. Концентрация боррелий в тканях очень низкая, поэтому микроскопические методы не позволяют обнаружить их в исследуемом материале. Низкая диагностическая ценность прямой микроскопии ограничивает ее широкое применение у больных.

2. **Изоляция возбудителя** возможна путем культивирования на специальных средах (BSK-II) из любого биологического материала (крови, ликвора, внутрисуставной жидкости и т.д.), но из-за малой его концентрации в органах и тканях и трудностей выращивания до сих пор не имеет широкого практического применения, хотя и привлекает внимание исследователей. По данным зарубежных авторов культуральный кожный тест обеспечивает подтверждение активной инфекции у 88% пациентов с клинически диагностированной мигрирующей эритемой. Выделение же спирохет из крови удается лишь у 3-10% обследованных, ликвора – 15-20%, внутрисуставной жидкости – 20-25%.

3. **Серологическая диагностика ИКБ**. Характеризуя серологические реакции, применяемые для диагностики ИКБ, несмотря на их различные варианты, в конечном итоге они сводятся к обнаружению специфических антител IgM и IgG классов. Достоверным лабораторным подтверждением диагноза считается не менее чем 4-х кратное нарастание титров антител при исследовании парных сывороток, полученных с интервалом не менее 3-4 недель. С целью более раннего подтверждения диагноза и своевременного проведения этиотропной терапии предложена схема проведения лабораторной диагностики клещевых инфекций у лиц, заболевших после присасывания клеща (таблица 1).

Таблица 1

**СХЕМА ОБСЛЕДОВАНИЯ БОЛЬНОГО НА КЛЕЩЕВЫЕ ИНФЕКЦИИ**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Стадия болезни** | **Материал для**  **исследования** | **Лабораторные методы** | |
| **прямые** | **серологические** |
| Инкубационный период  (до начала клинических  проявлений) | Биоптат из места  укуса клеща  Кровь | ПЦР | - |
| I стадия  (острый период)  до2 недель | Кровь, ликвор  Пунктат  лимфоузлов | ПЦР | ИФА IgM  - |
| II стадия  (диссеминированная инфекция, органная патология)  до1 месяца | Кровь,  Ликвор | - | ИФА IgM  ИФА IgG  РНИФ |
| III стадия  (хроническая форма)  свыше 3 месяцев | Кровь  Внутрисуставная  жидкость | -  ПЦР | ИФА IgG  РНИФ |
| Хроническая инфекция | Кровь | - | ИФА IgG  РНИФ |

Обязательным является двукратное серологическое обследование каждого больного: первая проба – в начале заболевания (при поступлении в стационар), вторая проба – через 14-20 дней. Образование IgM предшествует появлению IgG. На ранних стадиях уровень антител в крови больных повышается достаточно медленно, что является особенностью боррелиозной инфекции, а чувствительность серологических тестов не позволяет выявить в это время их низкое количество. В острой стадии у пациентов с мигрирующей эритемой антитела обнаруживаются в 20-30% случаев, при безэритемной форме положительные результаты наблюдаются несколько чаще. По мере прогрессирования заболевания возрастает число сероположительных результатов. Наиболее активно выработка антител класса G происходит при диссеминации возбудителей, а также у пациентов с хроническим течением ИКБ.

Чувствительность РНИФ позволяет принимать за положительных результат разведение сыворотки 1:40 и выше. При обнаружении в сыворотке крови диагностически значимых титров антител, или их 4-х кратное нарастание (что, к сожалению, бывает не более чем в 5% случаев) – результат оценивается как положительный, подтверждающий боррелиозную инфекцию. С помощью РНИФ достаточно трудно оценить эффективность проведенного этиотропного лечения, т.к. даже после элиминации возбудителей титры специфических антител сохраняются на прежнем уровне относительно долго (3-6 месяцев). Часто у переболевших, у которых в начале заболевания результат РНИФ расценивался как отрицательный, затем регистрируется нарастание титров антител, что не связано с персистенцией возбудителя, а является результатом запаздывания иммунного ответа.

Использование для ИФА рекомбинантных антигенов обусловливает высокую степень специфичности теста. Преимущество ИФА перед РНИФ заключается в возможности объективной оценки полученных результатов. По нашим данным чувствительность РНИФ при определении суммарных антител составила 74,0+3,1%, специфичность 56,4+3,5%. В ИФА при определении антител класса G и M чувствительность составила 85,3+2,5% и 76,4+3,0%, а специфичность 63,5+3,4% и 84,3+2,6% соответственно. Таким образом, метод РНИФ с использованием корпускулярного антигена оказался менее специфичным (р<0,05) и менее чувствительным (р<0,05), чем ИФА с использованием рекомбинантных антигенов. Таким образом, в настоящее время именно эти две реакции являются основными методами в серологической диагностике ИКБ.

Определение антител к белкам боррелий является основным способом лабораторной диагностики боррелиозов. Интерпретация результатов серологического исследования при отсутствии эпидемиологического анамнеза и стертой клинической картине заболевания существенно осложняется. Кроме того, жители эндемичных по ИКБ территориям нередко являются серопозитивными, поэтому частота обнаружения антител в крови пациентов может быть значительной. По нашим данным до 20-40% заболевших клещевыми инфекциями имеют положительные результаты РНИФ к боррелиям. В этой связи необходимо проведение подтверждающих тестов для установления истинного диагноза.

4. **Применение иммуноблота**. Наряду с распространенными иммуноферментными и иммуно-флуоресцентными методами используется иммуноблот, позволяющий одновременно определять антитела к нескольким антигенам, что делает его в определенных условиях более привлекательным.

Метод иммунного блоттинга (Western-blot) позволяет определить наличие специфических антител к определенным специфическим белкам возбудителя. Метод иммунного блоттинга – высокоинформативный метод обнаружения антител, обладающий высокой чувствительностью и специфичностью по сравнению с методами ИФА и РНИФ. Преимущество метода состоит в определении наличия специфических антител к определенным антигенам возбудителя. В ряде стран Европы широко используют двухшаговый метод серологической диагностики боррелиозов, обладающий высокой специфичностью и чувствительностью. Основным скрининг тестом в этой схеме является РНИФ или ИФА. Исследуемые образцы с положительными или сомнительными результатами подлежат дополнительному исследованию методом иммуноблотинга.

По результатам наших исследований с применением тест-системы Euroimmun “Anti-Borrelia-Euroimmun-WB” (Германия) у больных с клинически и лабораторно подтвержденным диагнозом «клещевой боррелиоз» в иммуноблоте выявлялись иммуноглобулины М и G к основным антигенам боррелий комплекса B.burgdorferi sensu lato. Проведены исследования в иммуноблоте сывороток крови больных с диагнозом ИКБ из различных районов Омской области. Сыворотки крови взяты при первом обращении больных и с интервалом 10-14 дней. Методом РНИФ у всех больных обнаружены антитела к боррелиям. Эти же сыворотки исследовались методом ИФА для выявления иммуноглобулинов классов М и G, положительные пробы затем исследовали в иммуноблоте. В результате исследований выявлены определенные спектры реагирования антител, выявляемых у больных, с диагностически значимыми антигенами боррелий. Иммуноглобулины класса М выявляли к белкам р66, р41, р39, р31, класса G – к белкам VlsE, р83, р66, р60, р41, р39, р31. Следовательно, применение двухшагового алгоритма в практике лабораторного подтверждения ИКБ позволяет избегать ложноположительных результатов и существенно повысить достоверность серологической диагностики ИКБ.

5. **Молекулярно-биологические методы**. В последние годы все большее значение в диагностике инфекционных заболеваний придается ПЦР, являющейся прямым доказательством наличия в крови больных ДНК возбудителя. Метод обладает высокой специфичностью и чувствительностью, как представляется он необходим не только для диагностики самого заболевания, но и выявления фазы патологического процесса, является ориентиром для проведения адекватного лечения и контроля его эффективности. Однако генетическая структура одних и тех же генных локусов у различных геновидов боррелий отличается большой степенью гетерогенности. Это обстоятельство накладывает определенные ограничения на выбор мишени для ПЦР, и, следовательно, на подбор праймеров такой структуры, которая бы гарантировала исключительную специфичность.

Несмотря на то, что аналитическая чувствительность ПЦР достигает 10 копий в исследуемом образце, имеются существенные ограничения этого метода, связанные с недостаточным, иногда кратковременным, накоплением возбудителя или его ДНК в различных биологических жидкостях и тканях. Поэтому диагностическая чувствительность ПЦР значительно варьирует в зависимости от выбранного клинического материала (в образцах биопсии кожи в месте локализации эритемы – 80-88%; в синовиальной жидкости с Лайм-артритом - высокие положительные показатели; в ликворе у пациентов с нейроборрелиозом – 50%). Большой интерес в качестве биоматериала для ПЦР представляет кровь – она обеспечивает возможность быстрой диагностики, что особенно важно при безэритемной форме ИКБ, с выявлением диссеминации возбудителя и случаев повторных заражений. Показатели выявления генетического материала боррелий в цельной крови, плазмы или сыворотки чрезвычайно варьирует (от 4 до 100%), но как правило, они невысоки. Такой незначительный процент выявления ДНК нередко связывают с непродолжительной неинтенсивной спирохетемией при гематогенной диссеминации возбудителя. Эффективность ПЦР может быть также повышена при совершенствовании ее методики, например при правильном выборе ДНК-мишеней и соответствующих им праймеров. Применение праймеров сразу к нескольким ДНК-мишеням в определенной степени повышает чувствительность реакции. С другой стороны, наличие в крови ингибиторов ПЦР – существенный недостаток, который может снизить количество положительных результатов. Один из факторов, способных значительно повысить результативность этой реакции для диагностики ИКБ, - определение в динамике инфекционного процесса временного промежутка, оптимального для взятия крови и постановки ПЦР. Проведенные исследования свидетельствуют о различной информативности ПЦР, используемой для лабораторного подтверждения ИКБ в разные сроки острого периода. В целом она относительно невысока, особенно в начале инфекционного процесса. Таким образом. ПЦР не может рассматриваться в качестве основного для лабораторной диагностики острого периода боррелиоза. Однако в ряде случаев ПЦР позволяет распознать инфекцию в ранние сроки, до формирования серологического ответа, или диагностировать ее серонегативную форму. С 1 по 7 день ДНК боррелий обнаруживалась лишь в небольшом числе проб. Оптимальным периодом индикации ДНК в крови были 8-14 дни от начала заболевания. Это совпадает с оптимальным сроком изоляции боррелий из крови пациентов культуральным методом, т.е. со сроками наиболее выраженной боррелиемии.

Диагностика иксодовых клещевых боррелиозов, характеризующихся склонностью к затяжному и хроническому течению с полисистемными поражениями, многообразием клинических проявлений, является одной из актуальных серьезных проблем современной инфекционной патологии. Из-за медленного формирования естественного иммунитета (максимальные титры антител класса IgM регистрируются только к третьей – шестой неделе болезни, а антител класса IgG – к 1,5 – 3 мес. от начала болезни) результаты серологического метода не могут являться окончательными критериями при постановке диагноза.При сравнении результатов вывления ДНК боррелий и антител, проведенного на примере анализа результатов, полученных при обследовании больных с эритемной формой ИКБ, отмечено, что с увеличением времени, прошедшего после присасывания клеща, количество проб, в которых детектируются антитела, увеличивается, а число проб, положительных в ПЦР, уменьшается.

Для достоверной диагностики иксодовых клещевых боррелиозов необходимо внедрение в клиническую практику «ступенчатой» диагностики, которая включает исследование крови методом ПЦР на наличие возбудителя (двухраундовая ПЦР и ПЦР в режиме реального времени) и антигенного ответа методом ИФА с последующем подтверждением результатов с помощью метода иммунного блоттинга в качестве подтверждающего теста при сомнительной и положительной реакции ИФА.

**Экспресс-диагностика возбудителей ИКБ после присасывания клеща**

С целью своевременного и эффективного проведения специфических профилактических мероприятий существенное значение имеет экспресс-диагностика возбудителей в снятом переносчике (в течение первых трех суток с момента присасывания). Для этих целей применяются методы обнаружения ДНК боррелий. Если клещ не сохранился или не подлежит исследованию вследствие неправильного сохранения, с целью ранней индикации возбудителей инфекций в организме пациента может быть исследована кровь или биоптат из места присасывания клеща методом ПЦР. Исследование биоптата (корочки) на месте присасывания наиболее эффективно, т.к. боррелии размножаются во входных воротах и не сразу попадают в кровь. В случае получения положительного результата, показано проведение экстренных профилактических мероприятий (превентивная антибиотикотерапия). Если результат исследований отрицательный, может быть проведено серологическое исследование сыворотки крови с интервалом 7-10 дней.

Применение антибиотиков в инкубационном периоде, когда количество боррелий еще невелико, что позволяет применять препараты в дозах и курсами значительно меньшими, чем при развившейся клинической форме. В качестве профилактических препаратов чаще применяются антибиотики тетрациклинового ряда (тетрациклин, вибрамицин). Предлагаются, особенно в педиатрической практике, пенициллины - ампициллин, ретарпен, бициллин. Схемы предлагаются разные, но чаще рекомендуется назначать препараты в обычных дозах в течение 3-5 дней. Вместе с тем бесконтрольное введение антибиотиков всем пострадавшим от нападения клещей (в том числе и не переносчиков ИКБ), а у некоторых лиц подобные эпизоды могут иметь место несколько раз в течение сезона, таит само по себе риск ущерба здоровью. В связи с этим до начала лечения требуется определить вид каждого удаленного клеща и установить его инфицированность. Для осуществления антибиотикопрофилактики предлагаются различные организационные подходы, суть которых сводится к созданию сезонных пунктов профилактики ИКБ, куда обращаются за помощью жители, пострадавшие от нападения клещей, и где осуществляется весь вышеперечисленный комплекс диагностических и профилактических мероприятий.