

Опыт применения метода ПЦР в реальном времени для диагностики инфекций, передающихся иксодовыми клещами

А. В. Ляпунов, М. А. Хаснатинов, Э. Л. Манзарова, Д. В. Егорова, Г. А. Данчинова
ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», Иркутск, Россия

Проанализированы результаты исследований 842 обращений в Центр диагностики и профилактики клещевых инфекций ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ (Иркутск) людей, пострадавших от иксодовых клещей в 2014 г. Диагностика на наличие РНК/ДНК возбудителей клещевого энцефалита, клещевого боррелиоза, моноцитарного эрлихиоза и гранулоцитарного анаплазмоза человека сывороток крови этих людей или клещей, снятых с пострадавших от их присасывания и укусов людей, проведена с помощью метода ПЦР

в реальном времени. Показана возможность применения этого метода для диагностики инфекций, передающихся иксодовыми клещами, и проведения эффективной профилактики с целью снижения инфекционной заболеваемости.

Ключевые слова: таежный клещ, степной клещ, клещевой энцефалит, клещевой боррелиоз, моноцитарный эрлихиоз человека, гранулоцитарный анаплазмоз человека, диагностика, ПЦР.

Real-Time PCR for the Diagnosis of Tick-Born Infections

A.V. Lyapunov, M.A. Hasnatinov, E.L. Manzarova, D.V. Egorova, G.A. Danchinova

Scientific Center of Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russia

Overall 842 cases of admission due to tick bites in Irkutsk area during 2014 were analyzed. Detection of DNA/RNA of the tick-born encephalitis virus, Lyme borreliosis, monocytic ehrlichiosis and granulocytic anaplasmosis in the human serum and in the ticks was performed using real-time PCR. According to the study results we

have demonstrate that real-time PCR could be used as a routine tool for diagnostics of tick-born infections.

Key words: tick-born infections, tick-born encephalitis, Lyme borreliosis, monocytic ehrlichiosis, granulocytic anaplasmosis, diagnosis, PCR.

Введение

Трансмиссивные инфекции, передающиеся человеку при укусах иксодовых клещей, являются серьезной угрозой для здоровья людей, проживающих в эндемичных районах. К настоящему времени в России обнаружено пять основных трансмиссив-

ных клещевых инфекций: *клещевой энцефалит* (КЭ), *болезнь Лайма* или *клещевой боррелиоз* (КБ), *клещевой риккетсиоз* (КР), *моноцитарный эрлихиоз человека* (МЭЧ) и *гранулоцитарный анаплазмоз человека* (ГАЧ) [1–6]. И в третьем тысячелетии проблема заболеваний, связанных с иксодовыми клещами, несмотря на пристальное внимание и предпринимаемые профилактические мероприятия (вакцинация, развитие сети центров диагностики инфекций, разработка современных репеллентов и противозенце-

Контактный адрес:
Галина Анатольевна Данчинова
Эл. почта: dan-chin@yandex.ru

фалитных костюмов и пр.), не теряет актуальности. Это связано с несколькими причинами: расширением ареалов и удлинением сроков активности иксодовых клещей, выявлением и генетическим разнообразием новых «клещевых» патогенов, регистрацией новых заболеваний, увеличением частоты контактов населения с природными и антропоургическими очагами, ростом урбанизации, туризма и т. д.

В Восточной Сибири многие из этих причин зависят, в том числе, от глобального потепления и взаимосвязи между собой. Практически ежегодно увеличивается число людей, пострадавших от укусов иксодовыми клещами, и, как следствие, растут показатели заболеваемости КЭ и КБ. Так, в 2014 г. по данным Роспотребнадзора по Иркутской области, показатель обращаемости населения по поводу укусов клещей превысил среднероссийский более чем в 1,5 раза (всего обратилось в лечебные учреждения 11 780 жителей области), а уровень заболеваемости КЭ — в 3,2 раза [7]. Кроме того, отмечена циркуляция *Anaplasma phagocytophilum* и *Ehrlichia chaffeensis/E. muris* — возбудителей ГАЧ и МЭЧ соответственно. Интересны факты обнаружения иксодовых клещей в Республике Саха [8]: за 2008–2014 гг. в 13 районах было собрано 32 экз. клещей *Ixodes persulcatus* и 14 экз. *Haemaphysalis concinna*, хотя авторы признают, что правильность определения клещей не подтверждена акарологами.

Для естественных и преобразованных человеком биоценозов Предбайкалья установлено обитание шести видов иксодовых клещей: *I. persulcatus* P. Sch., 1930 (таежный клещ); *I. lividus* Koch, 1844; *I. trianguliceps* Bir., 1895; *Dermacentor nuttalli* Ol., 1929 (степной клещ); *D. silvarum* Ol., 1932 (лесостепной клещ) и *H. concinna* Koch, 1844 [9], которые являются переносчиками разнообразных заболеваний вирусной, бактериальной и риккетсиозной природы. Кроме того, установлены случаи обращений людей, пострадавших от присасывания клещей других видов, причём как на территории региона, так и в других регионах страны [10].

Экстренная диагностика спектра клещевых инфекций с последующей специфической профилактикой (при необходимости) имеет первостепен-

ное значение для снижения заболеваемости. В соответствии с СанПиН сегодня в РФ регистрируется пять инфекционных заболеваний, передающихся иксодовыми клещами [11].

Материал и методы

В 2013 г. нами впервые апробирован метод *полимеразной цепной реакции* (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени», позволяющий идентифицировать возбудителей четырех инфекций в образцах проб от людей, пострадавших от укусов клещей. В 2014 г. этот метод был внедрен в практику Центра диагностики и профилактики клещевых инфекций ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ. Всего было исследовано 448 сывороток крови людей и 394 экз. иксодовых клещей двух видов (табл. 1).

Для детекции нуклеиновых кислот *вируса КЭ* (ВКЭ), боррелий, анаплазм и эрлий использовались коммерческую тест-систему «Amplisens® TBEV, *B. burgdorferi* s.l., *A. phagocytophilum*, *E. muris* / *E. chaffeensis* — F1» («АмплиСенс», Россия). Проведение амплификации, анализ и учёт результатов проводили с помощью прибора «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия). Подробные характеристики каждого исследованного образца с географической привязкой и детализацией обстоятельств обращаемости населения содержатся в электронных базах данных, зарегистрированных нами в Федеральной службе по интеллектуальной собственности, ежегодно обновляемых и пополняемых [12, 13].

Для оценки валидности полученных результатов все материалы параллельно исследовали с помощью методов диагностики, рекомендованных для экстренной индивидуальной профилактики заболеваний КЭ и КБ, дающих высокую эффективность, это — *иммуноферментный анализ* (ИФА) и микроскопия [11, 14]. Для выявления антигена ВКЭ в сыворотках крови и клещах использовали тест-системы «ИФА ТС АГ ВКЭ» (НПО «Микроген», Томск) и ВектоВКЭ-антиген (ЗАО «Вектор Бест», Новосибирск).

Пациентам, у которых был получен при первом обращении положительный результат на

Таблица 1. Материал и характеристика населения, пострадавшего от присасывания клещей

Материал для исследования	Количество проб	Число людей с полисами ДМС, n (%)	Число людей, вакцинированных от КЭ, n (%)	Средний возраст людей, лет
<i>Ixodes persulcatus</i>	361	172 (47,6)	46 (10,3)	35,69±1,61
<i>Dermacentor</i> sp.	33	20 (60,6)	6 (18,2)	27,00±2,88
Сыворотка крови	448	195 (43,5)	39 (10,8)	35,75±1,02
Всего ...	842	387 (46,0)	91 (10,8)	35,20±0,88

любой из патогенов комплекса клещевых инфекций, назначались профилактическое введение донорского иммуноглобулина и/или курс антибиотиков. Эффективность профилактических мероприятий у людей оценивали на основе выявления в сыворотке крови *иммуноглобулинов класса G (Ig G)* через 6 недель после проведения профилактики. Для выявления Ig G к ВКЭ и боррелиям применяли ИФА с тест-системами ЗАО «Вектор Бест» (Новосибирск). Для выявления Ig G к МЭЧ и ГАЧ использовали соответствующие наборы реагентов производства ООО «Омникс» (Санкт-Петербург). Все серологические исследования проводились в соответствии с инструкциями производителей.

При работе с пациентами соблюдались этические принципы, предъявляемые *Хельсинской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации* (World Medical Association Declaration of Helsinki), 1964, в редакции 2000 г. [15]. Все исследования проводились с одобрения Комитета по биомедицинской этике ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ и при информированном согласии пациентов.

Результаты

В ходе исследования установлено, что средний возраст людей, пострадавших от присасывания клещей, составляет 36–37 лет, с незначительным преобладанием лиц мужского пола (57%). Оказалось, что лишь каждый десятый человек имеет вакцинацию от КЭ и менее половины застрахованы по программам добровольного медицинского страхования «ДМС Антиклещ» с включенной услугой ПЦР-диагностики.

При экологогеографической характеристике установлено, что свыше 92% обследованных людей пострадали от укусов клещей в Иркутской области, в основном в пригороде, в зонах рекреационного освоения при посещении садоводческих товариществ или на отдыхе. У 58 (6,9%) человек присасывание клещей произошло на территории Республики Бурятия — в любимых местах отдыха иркутян (Тункинская долина, восточное

и юго-восточное побережье оз. Байкал). Случаи присасывания клещей в других регионах были единичны: по два человека пострадало в Забайкальском и Красноярском краях, по одному — в Алтайском и Приморском краях, Еврейской АО, Омской области и Республике Монголия.

В ПЦР, так же как при микроскопии фиксированных препаратов из содержимого кишечника клещей, чаще всего выявлялись возбудители КБ: в среднем — 12,7%, хотя у таежных клещей этот показатель почти в два раза выше (табл. 2).

Результаты исследования клещей и сывороток крови на клещевые инфекции приведены на рисунке. Наибольшая доля проб с наличием РНК/ДНК возбудителей «клещевых» инфекций выявлена среди *I. persulcatus*. Зараженность степных клещей ниже по всем изученным патогенам (см. табл. 2 и рисунок). Тем не менее, и единичные инфицированные степные клещи могут стать причиной серьезного заболевания.

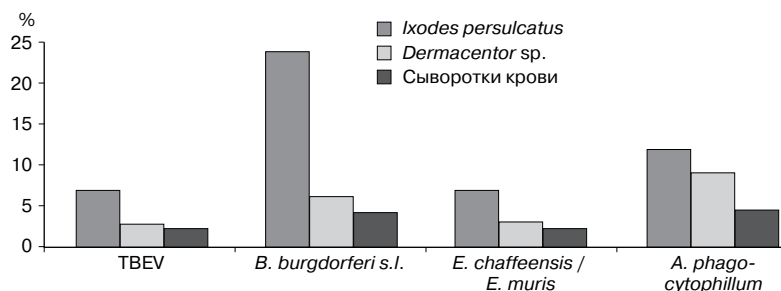
При исследовании сывороток крови людей обнаружено, что доля положительных находок по всем патогенам ниже, чем у клещей: в 2,6–2,9 раза для ВКЭ, *A. phagocytophillum*, *E. chaffeensis* / *E. muris* и в 5,3 раза для *B. burgdorferi sensu lato*. Этот факт служит еще одним доказательством того, что не каждый инфицированный клещ может заразить человека.

Также заслуживают особого внимания 6,5% микст-инфицированных клещей, у которых одновременно выявлено по два патогена в различных сочетаниях (табл. 3). Чаще всего у микст-инфицированных клещей встречались анаплазмы (52%), большинство из которых сочетались с боррелиями (61,5%) и ВКЭ (31%) и только одна — с эрлихиями. Кроме того, выявлен единичный случай инфицирования таежного клеща тремя различными возбудителями: ВКЭ, *B. burgdorferi s. l.* и *A. phagocytophillum*. Три эпизода микст-инфицирования (0,7%) обнаружено при анализе сывороток крови людей: у одного человека обнаружено одновременное инфицирование ВКЭ и эрлихиями,

Таблица 2. Результаты исследования клещей и сывороток крови людей на наличие РНК/ДНК возбудителей клещевых инфекций

Материал для исследования	ВКЭ*	<i>B. burgdorferi s. l.</i>	<i>E. chaffeensis</i> / <i>E. muris</i>	<i>A. phagocytophillum</i>	Всего
<i>I. persulcatus</i>	25	86	25	43	179
<i>Dermacentor</i> sp.	1	2	1	3	7
Сыворотка крови	11	19	10	20	60
Всего ...	37	107	36	66	246

Примечание. * В таблице приведены абсолютные числа.



Доля клещей и сывороток крови людей с РНК/ДНК ВКЭ (ТБЕВ), *B. burgdorferi s.l.*, *E. chaffeensis / E. muris*, *A. phagocytophillum*

у второго — ВКЭ и анаплазмами, у третьего — боррелиями и эрлихиями.

При одновременном заражении людей несколькими патогенами при единичном присасывании клещей существует опасность в неправильной постановке диагноза и некорректном проведении профилактических или лечебных мероприятий.

Для сравнения достоверности применения разных методик (ПЦР и ИФА) мы провели оценку результатов исследования сывороток крови на наличие ВКЭ и показали, что данные согласуются с материалами, полученными нами ранее (2007–2011 гг.). При анализе методом ИФА 14,2 тыс. сывороток крови людей через 2–3 суток после присасывания клещей доля положительных проб с антигеном ВКЭ варьировала от 2% в 2011 г. до 3,7% в 2010 г. [16]. Полученный нами в 2014 г. с помощью метода ПЦР результат в 2,5% случаев сопоставим с этими данными.

Всем людям, пострадавшим от присасывания зараженных клещей, было рекомендовано повторное обследование через 1,5–2 месяца после введения иммуноглобулина человека против ВКЭ и/или приема антибиотиков. Из них на контрольное обследование обратились менее половины (43,5%).

Анализ сывороток крови этих пациентов показал, что после проведения антибиотикопрофилактики в случае выявления в клеще или сыворотке крови возбудителей бактериальных инфекций (КБ, МЭЧ, ГАЧ) отмечается практически 100% эффективность. Лишь у одного человека с наличием возбудителя ГАЧ в момент обращения (9 июня), при повторном обследовании (28 июля) в сыворотке крови наблюдалось присутствие IgG-антител к ГАЧ. При изучении сроков обращения и обстоятельств присасывания клеща оказалось, что пациент обратился за помощью через две недели после укуса клеща с жалобами на температуру 38,5–39,8 °С, боль в мышцах и ломоту в суставах. Возможно, этот пациент, направленный в инфекционную больницу, по результатам первичного обращения не получил адекватного лечения, поскольку в течение 2014 г. в Иркутской области официально не было зарегистрировано ни одного случая ГАЧ.

При изучении эффективности профилактики КЭ было показано, что у 28% невакцинированных от КЭ людей, подвергшихся укусу инфицированного ВКЭ клеща, выявлялись IgG-антитела в титре от 1:200 до 1:2000 через полтора месяца после введения противоклещевого иммуноглобулина. Однако при этом никаких жалоб на протяжении всего периода после присасывания клеща эти пациенты не предъявляли. Этот факт может свидетельствовать либо о естественной иммунизации, либо о нарушении сроков вакцинации, когда человек, не желающий проверить напряженность иммунитета, считается не вакцинированным, либо о легкой форме заболевания после произошедшего присасывания клеща.

Таблица 3. Сочетания и количество случаев выявления двух-трех патогенов в клещах, снятых с людей (по результатам ПЦР)

Патогены и их сочетания	Наименование и количество патогенов / сочетаний				
	2 патогена				3 патогена
	ВКЭ	<i>B. burgdorferi s.l.</i>	<i>E. chaffeensis / E. muris</i>	<i>A. phagocytophillum</i>	<i>B. burgdorferi s.l.</i> + <i>A. phagocytophillum</i>
ВКЭ	—	4	3	4	1
<i>B. burgdorferi s.l.</i>	4	—	5	8	—
<i>E. chaffeensis / E. muris</i>	3	5	—	1	—
<i>Phagocytophillum</i>	4	8	1	—	—
<i>B. burgdorferi s.l.</i> + <i>A. phagocytophillum</i>	1	—	—	—	—

Заключение

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют как об актуальности проблемы для медицинской науки и практического здравоохранения, так и о возможности применения метода ПЦР в реальном времени для диагностики инфекций, передающихся иксодовыми клещами, что позволяет выявить наличие возбудителей КЭ,

ИКБ, МЭЧ и ГАЧ в клеще или сыворотке крови, провести эффективную профилактику и, тем самым, снизить инфекционную заболеваемость.

Установлено, что в Байкальском регионе таежные клещи являются основными переносчиками исследованных нами патогенов. Степные клещи также могут являться носителями всех этих инфекций, но в гораздо меньшей степени могут влиять на осложнение эпидемиологической ситуации.

Литература

1. Коренберг Э.И., Ковалевский Ю.В., Кузнецова Р.И. и др. Выявление и первые результаты изучения болезни Лайма на Северо-Западе СССР. Мед паразитол и паразитарные болезни 1988; 1:45-8.
2. Alekseev A.N., Dubinina N.V., Van De Pol I., Schouls L.M. Identification of *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi* in ixodes ticks in the Baltic regions of Russia. J Clin Microbiology 2001; 39(6):2237-42.
3. Борисов В.А., Малов И.В., Ющук Н.Д. Клещевой энцефалит. - Новосибирск, «Наука», 2002.
4. Афанасьева М.В., Воробьева Н.Н., Коренберг Э.И. и соавт. Гранулоцитарный анаплазмоз человека: особенности клинических проявлений в России. Инфекционные болезни. Научно-практический журнал Российского общества инфекционистов 2006; 4(2):24-8.
5. Шпынов С.Н., Рудаков Н.В., Гранитов В.М. и соавт. Выявление альфа1-протеобактерий в иксодовых клещах и образцах от больных в России. Омский научный вестник 2006; 3:32-7.
6. Коренберг Э.И., Помелова В.Г., Осин Н.С. Природно-очаговые инфекции, передающиеся иксодовыми клещами. М., «Наука», 2013.
7. Официальный сайт Управления Роспотребнадзора по Иркутской области http://38.rospotrebnadzor.ru/c/journal/view_article_content?groupId=10156&articleId=328812&version=1.0 (дата обращения 04.03.2015).
8. Решетников А.Д., Барашкова А.И., Прокопьев З.С. Иксодовые клещи (Ixodida: Ixodidae) Якутии. Теоретические и прикладные аспекты современной науки 2014; 5:141-3.
9. Данчинова Г.А., Хаснатинов М.А., Сунцова О.В. и соавт. Переносчики и возбудители трансмиссивных клещевых инфекций на юге Восточной Сибири и севере Монголии. Бюллетень ВСНЦ СО РАМН 2004; 1-3:107-12.
10. Данчинова Г.А., Ляпунов А.В., Хаснатинов М.А. и соавт. Эколого-географическая характеристика обращаемости людей, пострадавших от укусов клещей в Иркутской области и за её пределами. Сибирский медицинский журнал 2012; 4:64-7.
11. СП 3.1.3.2352-08. Профилактика инфекционных болезней. Кровяные инфекции. Профилактика клещевого вирусного энцефалита. М.; 2008.
12. Данчинова Г.А., Ляпунов А.В., Петрова И.В. и др. Информационно-справочная система «Пациенты, подвергшиеся укусу клеща, результаты лабораторных исследований их клещей и сывороток крови, и меры профилактики» (ИСС «Клещи»). Программы для ЭВМ. Базы данных. Топологии интегральных микросхем 2009; 1.
13. Данчинова Г.А., Ляпунов А.В., Хаснатинов М.А. и соавт. Информационно-аналитическая система «Регистр обращаемости населения за медицинской помощью, результаты лабораторных исследований и профилактика инфекций» (ИАС «Регистр-инфекции»). Программы для ЭВМ. Базы данных. Топологии интегральных микросхем 2015; 2(100), 20.02.2015.
14. Коренберг Э.И. Методические указания по эпидемиологии, диагностике, клинике и профилактике болезни Лайма. М.; 1991.
15. Хельсинская декларация всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» (в редакции 52-й сессии Генеральной Ассамблеи ВМА в Эдинбурге, Шотландия, октябрь 2000 г).
16. Хаснатинов М.А., Ляпунов А.В., Данчинова Г.А. и соавт. Клещевой энцефалит: встречаемость и профилактика инфекции на доклинической стадии у людей, пострадавших от присасывания иксодовых клещей. Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы 2012; 5:19-24.