



ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕТОДОВ В ДИАГНОСТИКЕ КЛЕЩЕВЫХ ИНФЕКЦИЙ: КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА, ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕВЫХ БОРРЕЛИОЗОВ

Карань Л.С.

ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора

Клещевой энцефалит

Клещевой энцефалит (КЭ) — трансмиссивное вирусное заболевание с выраженной сезонностью, зависящей от периода активности иксодовых клещей, и природной очаговостью. Возбудитель — вирус клещевого энцефалита (ВКЭ), относящийся к РНК-вирусам рода *Flavivirus*. Заражение человека может происходить как трансмиссивным, так и алиментарным путем при употреблении в пищу сырого козьего молока, а так же его термически не обработанных продуктов.

Проблема заболеваемости клещевым энцефалитом (КЭ), как и прежде, продолжает оставаться актуальной для здравоохранения Российской Федерации

(РФ) и имеет медицинское и социальное значение. Заболеваемость КЭ отмечается более чем в 25 европейских странах: Австрии, Чехии, Финляндии, Германии, Венгрии, Швеции, Швейцарии, Польше, Словакии, Латвии, Литве, Эстонии и в ряде азиатских стран: Казахстане, Китае, Японии, Корее. В России ежегодно случаи КЭ регистрируются в 45 субъектах РФ. Согласно данным Роспотребнадзора РФ в 2011 году Федерального государственного учреждения здравоохранения (ФГУЗ) РФ в 2006 году КЭ был зарегистрирован на 49 административных территориях, причем полностью эндемичными по КЭ стали территории 18 субъектов РФ. Около 70 процентов всех случаев КЭ прихо-

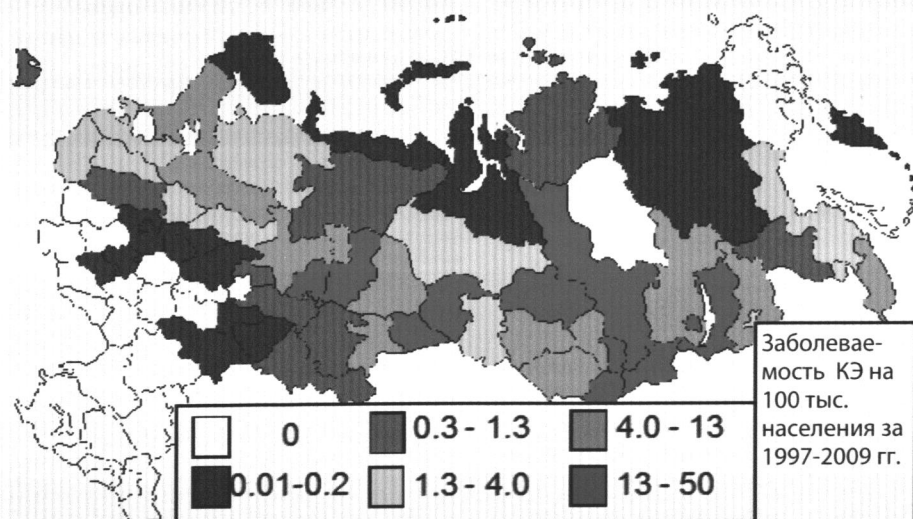


Рис. 1. Карта регистрации заболеваемости КЭ в РФ

дится на Уральский и Сибирский федеральные округа.

Информация об эндемичных территориях содержится на сайтах *rospotreb-nadzor.ru* и *encephalitis.ru*.

В последние годы большинство заболевших (до 80%) составляют жители городов, а не «лесных» профессий, как это было ранее (по сравнению с пятидесятью-шестьдесятью годами прошедшего столетия). Заражение людей происходит преимущественно в антропоургических очагах, появившихся в большом количестве вблизи городов. Широко развернутое жилищное и дачное строительство в пригородных лесах, массовые выезды горожан за город способствуют увеличению контактов людей с иксодовыми клещами.

Как известно, существуют различия в тяжести заболевания в разных частях ареала ВКЭ. На Дальнем Востоке России число тяжелых очаговых форм достигает 60–70%, летальность — более 10%, тогда как в Сибири, на Урале и в западной части ареала преобладают лихорадочные и менингеальные формы, летальность редко превышает 1%.

Особенности современного КЭ меняют существующие представления о рациональных подходах к профилак-

тике этого заболевания. Основным инструментом защиты от КЭ на современном этапе является вакцинопрофилактика. В РФ с этой целью разрешены к применению 6 препаратов, иммунизация которыми проводится согласно инструкциям к препаратам.

Также для профилактики КЭ в случае отсутствия в анамнезе вакцинации и обнаружения в клеще РНК вируса клещевого энцефалита или вирусного антигена не позднее 96 часов от момента присасывания клеща проводится профилактика заболевания с использованием специфического противоклещевого иммуноглобулина.

Для обнаружения вируса в клеще используются прямые методы диагностики: детекция антигена ВКЭ в иммуноферментном анализе или детекция вирусной РНК с помощью полимеразно-цепной реакции (например, с набором «АмплиСенс® TBEV, B. burgdorferi sl, A. phagocytophilum, E. chaffeensis / E. muris-FL», ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва). Данный набор предназначен для выявления РНК TBEV — вируса клещевого энцефалита (Tick-borne encephalitis virus), *Borrelia burgdorferi sl* — возбудителя иксодовых клещевых боррелиозов (ИКБ),

Схема иммунизации вакцинами против КЭ

Вакцины КЭ	Способ, доза	Первичный курс	Ревакцинация	Экстренная схема
Вакцина КЭ, ФГУП ИПВЭ им. М. П. Чумакова, г. Москва	в/м 0,5 мл	2-кратно (интервал 1-7 мес.)	Через 12 мес. после окончания первичного курса — одна прививка. Последующие прививки — каждые 3 года — одна инъекция	
«Энцевир», ФГУП «Микроген», НПО «Вирион», г. Томск	в/м 0,5 мл	2-кратно (интервал 1-2 месяца или 5-7 мес.)	Через 12 мес. — одна прививка. Последующие прививки — каждые 3 года — одна инъекция	2 прививки с интервалом 2 недели
«ФСМЕ-иммун инъект-взрослый», «ФСМЕ-иммун инъект-детский», Бакстер, Австрия	в/м 0,5 мл	2-кратно (интервал 1-3 мес.)	Через 9-12 мес. — одна прививка. Последующие прививки — каждые 3 года — одна инъекция	2 прививки с интервалом 2 недели
«Энцепур-взрослый», «Энцепур-детский», Кайрон Беринг, Германия	в/м 0,5 мл	2-кратно (интервал 1-3 мес.)	Через 12 мес. — одна прививка. Последующие прививки — каждые 3 года — одна инъекция	3 три прививки с интервалами 0-7-21 день

Ehrlichia chaffeensis и *Ehrlichia muris* — возбудителей моноцитарного эрлихиоза человека (МЭЧ), ДНК *Anaplasma phagocytophilum* — возбудителя гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ) в клещах, крови, ликворе, аутоптатах методом ПЦР.

Показанием к обследованию пациента на инфицированность ВКЭ является лихорадка, сильная головная боль, тошнота, рвота, миалгии в области шеи и спины, менингеальные симптомы, возникшие после присасывания клеща, посещения лесной зоны, употребления в пищу сырого молока в эпидемический сезон.

Основным методом лабораторной диагностики КЭ является определение специфических иммуноглобулинов классов М и G в сыворотке крови и/или в ликворе. IgM антитела к вирусу ВКЭ появляются с 3–4-го дня от начала заболевания, IgG — в среднем на 10–14-й дни. Обязательным является исследование парных сывороток, взятых с интервалом 7–10 дней. Диагноз КЭ ставится на основании обнаружения антител класса IgM и 4-кратного нарастания IgG антител в парных сыворотках.

Выявление РНК ВКЭ в плазме крови и ликворе больных острой формой клещевого энцефалита целесообразно проводить на первой неделе заболевания. Данный метод лабораторной диагностики применяется только в комплексе с анализом сыворотки на наличие специфических антител, так как при высокой диагностической специфичности, он обладает в случае данного возбудителя недостаточной чувствительностью, которая не превышает 50% (относительно обнаружения специфических антител методом ИФА). Но ранняя диагностика КЭ позволит своевременно применить средства симптоматической и этиотропной терапии. ПЦР метод применяется и в случае расщепления летальных исходов при очаговой форме КЭ.

Иксодовые клещевые боррелиозы

Возбудители боррелиозов относятся к порядку Spirochaetales, семейству Spirochaetaceae, роду *Borrelia*. В группу иксодовых клещевых боррелиозов (ИКБ) входят заболевания, вызываемые в большинстве случаев тремя представителями комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato*: *B. burgdorferi*, *B. garinii* и *B. afzelii*. Изучается патогенный потенциал других боррелий комплекса: *B. spilmanni*, *B. valaisiana*, *B. lusitanae*, *B. bissettii*, *B. sinica*. Человек инфицируется боррелиями при присасывании зараженных клещей *I. persulcatus* и *I. ricinus*. Спонтанная инфицированность боррелиями клещей вида *I. ricinus* составляет в среднем 20%, клещей *I. persulcatus* — 40%. Сезон активности иксодовых клещей начинается в последней декаде апреля и продолжается в средней полосе России до октября, а в Приморье — до ноября. ИКБ распространен в России на 69 административных территориях, наибольшая заболеваемость регистрируется в Кировской, Томской и в последние годы — Вологодской и Ярославской областях.

К методам профилактики боррелиоза относится антибиотикопрофилактика, которая проводится по результатам исследования клеща на наличие ДНК возбудителей ИКБ (например, с вышеописанным набором «АмплиСенс® TBEV, *B. burgdorferi* sl, *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis* / *E. muris*-FL», а также «АмплиСенс® *Borrelia burgdorferi sensu lato*-FL», «АмплиСенс® *Borrelia burgdorferi sensu lato*-EPH», ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва). Также клеща на наличие спирохет исследуют методом темнопольной микроскопии. Чувствительность данного метода в 10–100 раз меньше, чем чувствительность диагностических тест-систем на основе ПЦР. В клиническом эксперименте показано как минимум десятикратное снижение числа заболевших среди тех, кто провел профилактический курс приема антибиотиков по результатам исследова-

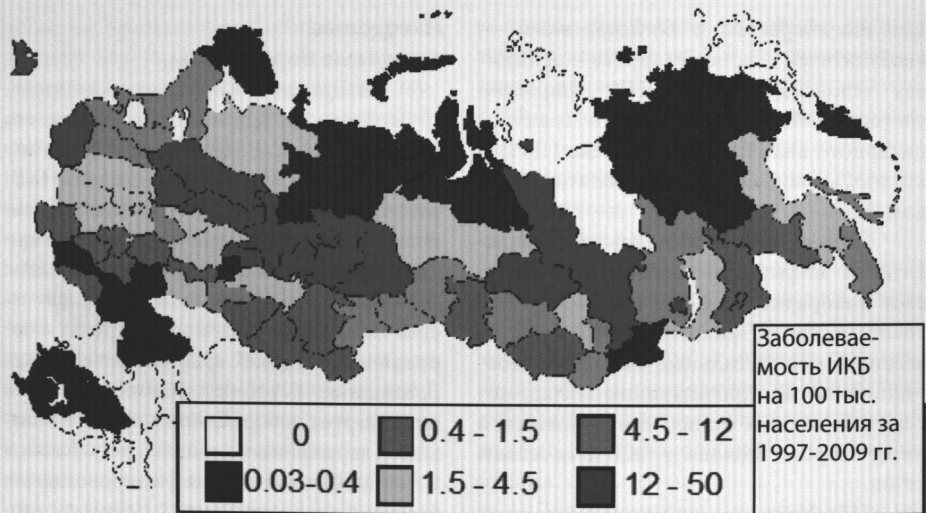


Рис. 2. Карта регистрации заболеваемости ИКБ в РФ

ния клеща на наличие ДНК патогенных боррелий.

Клинически выраженное заболевание развивается приблизительно в 20–25% случаев после присасывания инфицированных боррелиями клещей. В результате попадания боррелий в кожу у 50–80% больных отмечается местное кожное воспаление — клещевая мигрирующая эритема (КМЭ), диаметр которой, как правило, превышает 5 см (рис. 3А). В 20–50% случаев заболевания КМЭ отсутствует в начале заболевания и таким образом сразу развивается диссеминированная стадия ИКБ, которая носит название безэритемной формы. В случае гематогенного распространения боррелии поражают внутренние органы, что сопровождается развитием общеинфекционного синдрома и клиническими проявлениями со стороны висцеральных органов (печени, селезенки, почек). Нарушения со стороны нервной системы проявляются в основном поражением проводящей системы и развитием миокардита. Артралгии мелких и крупных суставов указывают на поражение опорно-двигательной системы. В случае поражения нервной системы возникают менингит (менингоэнцефалит), радикулоневрит,

неврит черепных нервов. Наиболее часто поражается VII пара, нередко с парезом лицевых мышц, что является еще одним, кроме КМЭ, характерным признаком ИКБ. В ряде случаев, особенно при поздно начатом лечении, заболевание переходит в третью — хроническую — стадию, для которой в настоящее время доказана только одна клиническая форма — хронический атрофический акродерматит — ХААД (рис. 3Б).



Рис. 3. А. Клещевая мигрирующая эритема; Б. Хронический атрофический акродерматит. Фото: www.infectology.ru/nosology/infectious/tick_borne/lyme6.aspx

Показанием для исследования на ИКБ является наличие клещевой мигрирующей эритемы, развитие общеинфекционного синдрома, артралгии, нарушения со стороны нервной системы, возникшие после присасывания клеща, пребывания в лесопарковой зоне в эпи-

демического сезона. Следует иметь в виду, что хотя в среднем инкубационный период составляет 14 дней, первые признаки заболевания могут появиться через два месяца после присасывания клеща.

Основным методом лабораторной диагностики ИКБ является **определение специфических антител в сыворотке крови**. Антитела класса IgM начинают обнаруживаться к концу второй недели заболевания, IgG — на 3–4-й неделе заболевания.

При исследовании парных сывороток крови (взятых с интервалом 3–4, но не менее 2 недель) методом ИФА клинический диагноз ИКБ на I стадии подтверждается при установлении факта сероконверсии, как правило, за счет IgM антител, но возможно и за счет 4-кратного увеличения титра IgG антител. Увеличение титров IgM антител в парных сыворотках при высоких значениях титров IgG антител может наблюдаться при подостром течении заболевания, при переходе локальной формы в диссеминированную (II стадия) и при обострении хронической формы заболевания. При хронической (III) стадии заболевания, как правило, выявляются высокие титры IgG антител практически в 100% случаев, хотя в 5–50% случаев также могут обнаруживаться IgM антитела. Если диагноз клещевой боррелиоз ставится первично, необходимо учесть данные эпидемиологического и клинического анамнеза.

Для оценки динамики уровня антител необходимо использовать тест-системы одного производителя. Определение

динамики титров противоборрелиозных антител не может быть методом оценки эффективности терапии ИКБ.

У больных с поражениями центральной нервной системы **специфические антитела могут определяться в ликворе**. Для выяснения роли боррелий в клинической симптоматике нарушений ЦНС необходимо определить наличие синтеза антител к боррелиям, обусловленное существующим патологическим процессом. При боррелиозном поражении нервной системы в 50–60% случаев происходит интратекальный синтез антител. Количество антител в субарахноидальном пространстве зависит от их концентрации в сыворотке крови, проницаемости гематоэнцефалического барьера и пропорции интратекального синтеза. Интратекальный синтез антител определяется путем вычисления ликвор-сывороточного индекса (ЛСИ). Для этой цели определяется относительная концентрация (титры) специфических иммуноглобулинов (или иммуноглобулинов отдельных классов) и общих иммуноглобулинов (г/л) в сыворотке крови и ликворе. Забор материала следует проводить в один день. ЛСИ рассчитывается как отношение (на примере IgG антител): (специфические IgG (ликвор) × общие IgG (сыворотка)) / (общие IgG (ликвор) × специфические IgG (сыворотка)). Показатели индекса больше 2 расцениваются как положительные. Значения между 1,5 и 2 — пограничные величины индекса. Таким же образом **интратекальный синтез антител может определяться в си-**

Наша лаборатория выполняет ряд исследований для диагностики инфекций, передающихся с укусом клеща:

- АТ к вирусу клещевого энцефалита IgG;
- АТ к возбудителю боррелиоза (болезни Лайма) IgG/IgM;
- *Borrelia burgdorferi* sl методом ПЦР;
- Комплекс «ПЦР-выявление возбудителей заболеваний, передающихся с укусом клеща» (вирус клещевого энцефалита, *Borrelia burgdorferi* sl, *Ehrlichia chafeensis* / *Ehrlichia muris*, *Anaplasma phagocytophilum*).

Приглашаем к сотрудничеству!

Таблица 1

Оценка результатов при выявлении антител класса IgM

Отрицательный	Положительный	Неопределенный
<ul style="list-style-type: none"> Не выявлено антител ни к одному из антигенов. Выявлены антитела только к антигену p17 и/или p100 	<ul style="list-style-type: none"> Выявлены антитела к белку OspC Выявлены антитела как минимум к двум антигенам из группы: p41, VlsE, p17 	<ul style="list-style-type: none"> Выявлены антитела только к одному антигену из группы: p58, p41, p39, BVK32, VlsE

Таблица 2

Оценка результатов при выявлении антител класса IgG

Отрицательный	Положительный	Неопределенный
<ul style="list-style-type: none"> Не выявлено антител ни к одному из антигенов. Выявлены антитела только к антигену p17 	<ul style="list-style-type: none"> Выявлены антитела к белку VlsE Выявлены антитела как минимум к двум антигенам из группы: p83-100, p58, p41, p39, BVK32, OspC, p17 	<ul style="list-style-type: none"> Выявлены антитела только к одному антигену из группы: p83-100, p58, p41, p39, BVK32, OspC

новиальной жидкости при поражениях опорно-двигательного аппарата.

Иммуный блоттинг применяют для подтверждения специфичности результатов выявления антител, полученных методом ИФА. Ложноположительные результаты при использовании этого метода могут быть получены у больных с другими спирохетозами: сифилисом и лептоспирозом, у пациентов с ревматоидным артритом неборрелиозной этиологии и другими системными заболеваниями, у пациентов с герпесвирусной инфекцией, вызванной цитомегаловирусом и вирусом Эпштейн-Барр, а также у беременных. В основе метода иммунного блоттинга лежит обнаружение специфических антител к определенным белкам возбудителя. В качестве антигенов в основном используются рекомбинантные белки p83-100, p58, p41i, p39 (VmpA), OspC (p20-25), p17 (DbpA), BVK32, VlsE, полученные для двух, а иногда и для трех генов боррелий. Интерпретация результатов иммунного блоттинга как положительных в основном сводится к выявлению антител одновременно к не-

скольким рекомбинантным антигенам боррелий для повышения специфичности теста.

Обнаружение ДНК и РНК боррелий методом ПЦР может быть выполнено во всех видах биологического материала (кровь, ликвор, моча, синовиальная жидкость, биоптаты кожи, например с использованием тест-системы «АмплиСенс® TBEV, B. burgdorferi sl, A. phagocytophilum, E. chaffeensis / E. muris-FL»). Молекулярно-биологические исследования целесообразно применять в комплексе с выявлением антител. Прямым показанием для применения ПЦР являются боррелиозные менингиты, менингоэнцефалиты, наличие атипичной эритемы, рефрактерные артриты у пациентов с наличием противоборрелиозных антител. Диагностическая чувствительность данного метода составляет от 20 до 35% при исследовании крови в остром периоде на первой неделе заболевания, от 20 до 80% при исследовании синовиальной жидкости при развитии Лайм-артрита и около 10-30% — при исследовании ликвора при нейроборрелиозе.



ИнтерЛабСервис

FUTURE

IN REAL TIME

www.interlabservice.ru

Набор реагентов для ПЦР-диагностики инфекций, передаваемых клещами



«АмплиСенс® TBEV,
B.burgdorferi sl,
A.phagocytophillum,
E.chaffeensis/E.muris-FL»

 **AmpliSens**
biotechnologies

4 возбудителя в одном наборе:

- вирус клещевого энцефалита
- возбудители иксодового клещевого боррелиоза *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*B.burgdorferi sensu stricto*, *B.afzelii*, *B.garinii*)
- возбудители моноцитарного эрлихиоза человека *Ehrlichia muris* и *Ehrlichia chaffeensis*
- возбудитель гранулоцитарного анаплазмоза человека *Anaplasma phagocytophillum*

Аналитическая чувствительность – 5×10^3 ГЭ/мл для всех заявленных микроорганизмов

Исследуемый материал:
клещи, кровь, ликвор, аутопаты

Преимущества:

Одновременное выявление и идентификация 4-х возбудителей – возможность использовать при скрининге большого количества иксодовых клещей

Единый протокол выделения, обратной транскрипции и амплификации

Существенная экономия времени и расходных материалов

Широкий спектр совместимых амплификаторов: Rotor-Gene 3000 / 6000 / Q, IQ5, Mx 3000 DT-99

