

Выявление возбудителей клещевого риккетсиоза в клещах и крови пациентов на Дальнем Востоке с помощью ПЦР-анализа в режиме реального времени

Е.И. Бондаренко¹, к.м.н., н.с.

Е.В. Мокрецова², к.м.н., доцент

Н.И. Здановская³, зав. лабораторией

Н.П. Высочина³, зав. лабораторией

Н.М. Пуховская³, к.м.н., врач-вирусолог

Д.И. Тимофеев¹, к.б.н., с.н.с.

М.К. Иванов^{1,4}, к.б.н., зав. лабораторией

¹ ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск;

² Дальневосточный государственный медицинский университет, г. Хабаровск;

³ Хабаровская противочумная станция;

⁴ Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

С помощью разработанных тестов, основанных на ПЦР с детекцией в реальном времени, проведен анализ 48 клещей *Haemaphysalis concinna*, собранных на флаг в Амурской области, на присутствие патогенных микроорганизмов, и в 25% случаев выявлен единственный вид риккетсий – *R. heilongjiangensis*, являющийся патогенным для человека. С помощью этих же тестов в сыворотках, полученных в острый период заболевания из крови 3 из 40 больных, госпитализированных в г. Хабаровске в 2012 г. с диагнозом «клещевой риккетсиоз», была ретроспективно выявлена ДНК патогенных риккетсий *R. heilongjiangensis* и *R. sibirica*. Результаты ПЦР-анализа подтверждены секвенированием переменных участков генома риккетсий. Показана возможность перекрестной реакции при анализе пациента, инфицированного *R. heilongjiangensis*, серологическими тестами, ориентированными на *R. sibirica*.

Specially developed real-time PCR-based tests were used to test 48 *Haemaphysalis concinna* ticks collected by flag dragging in the Amur region for the presence of pathogenic microorganisms. In 25% of cases we identified only one *Rickettsia* species, i.e., *R. heilongjiangensis*, which is pathogenic to humans. Using the same tests with sera obtained during the acute period of the disease from the blood of 3 out of 40 patients hospitalized in the city of Khabarovsk in 2012 diagnosed with «tick typhus» we retrospectively identified DNA of pathogenic rickettsiae *R. heilongjiangensis* and *R. sibirica*. PCR results were confirmed by sequencing of the variable genome regions of the rickettsiae. The possibility of a cross-reaction is shown when a patient infected with *R. heilongjiangensis* is tested making use of serologic tests for *R. sibirica*.

Ключевые слова: риккетсиоз, клещевые инфекции, ПЦР-диагностика

Key words: rickettsiosis, tick-borne infections, PCR diagnostics.

Введение

В последние десятилетия во многих странах мира, в том числе и в России, отмечается рост выявления природно-очаговых заболеваний, вызываемых риккетсиями (риккетсиозов), которые объединены в группу клещевых пятнистых лихорадок (КПЛ) [1, 2, 3]. На территории России официально регистрируют два риккетсиоза этой группы: астраханская пятнистая лихорадка, с этиологическим агентом *Rickettsia conorii subsp. caspia subsp. nov.* и клещевой риккетсиоз (КР), вызываемый *R. sibirica sensu stricto* [3]. Название «клещевой риккетсиоз» определяет этиологию этого заболевания и его связь с переносчиками, в основном иксодовыми клещами родов *Dermacentor* и *Haemaphysalis*, распространенных в природных очагах Сибири и Дальнего Востока [4]. Официально в России КР регистрируется как «Сибирский клещевой тиф» (СКТ), согласно формам федерального статистического наблюдения

Росстата «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях». В международном классификаторе болезней (МКБ) клещевому риккетсиозу соответствует «пятнистая лихорадка, вызываемая *R. sibirica*». В различных литературных источниках и медицинской практике встречается целый ряд иных исторически сложившихся вариантов названия этого заболевания (клещевой сыпной тиф Северной Азии, клещевой риккетсиоз Северной Азии, клещевой риккетсиоз Сибири и Дальнего Востока, сибирский клещевой сыпной тиф, сыпная клещевая лихорадка, восточный сыпной тиф).

В настоящее время во всем мире выявлено 16 видов риккетсий, являющихся возбудителями заболеваний человека из группы КПЛ. Из них на территории РФ обнаружены 7 видов: *R. conorii*, *R. sibirica*, *R. heilongjiangensis*, *R. slovacica*, *R. aeschlimannii*, *R. helvetica*, *R. raoultii* [3]. В России из этих 7 видов риккетсий официально лишь два связываются с заболеваниями человека:

R. conorii (возбудитель Астраханской клещевой лихорадки) и *R. sibirica sensu stricto* (возбудитель СКТ). Что касается других видов, то внимание к ним существенно меньше либо вообще отсутствует. Так, несмотря на то, что зараженность клещей *I. ricinus*, часто нападающих на людей, в Московской области риккетсиями *R. helvetica* составляет 15%, случаи заражения людей данным видом риккетсий в этом регионе официально не описаны. Клещи рода *Dermacentor* во всех природных очагах на территории РФ высоко инфицированы *R. raoultii* (30–70%) однако отмечено лишь несколько доказанных случаев заболевания человека в России, связанных с этим видом. В ряде европейских стран *R. slovaca* рассматривается как этиологический агент синдрома TIBOLA (от «tick-borne lymphadenopathy»), однако в России, где этот возбудитель выявлен в клещах рода *Dermacentor* в Ставропольском крае, в Воронежской и Курганской областях [5], данное заболевание пока не зарегистрировано. В Ставропольском крае из клещей *Hyalomma marginatum marginatum* выделена также патогенная *R. aeschlimannii* [6].

Природные очаги СКТ обнаружены в 18 административных территориях юга Дальнего Востока, Западной и Восточной Сибири, однако более 80% случаев приходится на Алтайский и Красноярский край [3]. Статистика заболеваемости по стране может значительно варьировать год от года. Так, в 2001 г. было зарегистрировано 3460 случаев СКТ, в то время как в 2009 – в два раза меньше, 1692 случая [7].

На ранней стадии заболевания клещевые риккетсиозы диагностируются на основании анализа клинико-эпидемиологических данных. Проблема состоит в том, что их симптоматика, как и в случае ряда других клещевых инфекций, не всегда является специфичной. Необходимо учесть, что первичный аффект у больных может не наблюдаться или не иметь выраженного проявления, а факт присасывания клеща может остаться не замеченным пострадавшим. Известные риккетсиозы, как правило сопровождаются острыми лихорадочными проявлениями, однако это проявление характерно для большинства клещевых инфекций. Лабораторная диагностика клещевых риккетсиозов включает выделение возбудителя, определение его антигенов, выявление антител к риккетсиям соответствующих видов с использованием серологических методов. Серологические методы являются основными при подтверждении диагноза КР. Все методы серологической диагностики КР в России ориентированы на выявление одного вида риккетсий, а именно *Rickettsia sibirica*. Для серологической диагностики используют различные подходы: микрометод реакции связывания комплемента (РСК) с цельнорастворимым антигеном *R. sibirica*, реакция непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ), реакция непрямой гемагглютинации (РНГА). Во всех случаях используют специфические антигены, выделенные

из биомассы *R. sibirica*, полученной при заражении развивающихся куриных эмбрионов: в случае РСК – цельнорастворимый антиген *R. sibirica*, в случае РНИФ – корпускулярный антиген, в случае РНГА – липополисахаридный комплекс. Таким образом, все методы серологической диагностики КР в России ориентированы на выявление одного вида риккетсий, а именно *Rickettsia sibirica*.

Всего на территории России выявлено два подвида *R. sibirica*: *R. sibirica subsp. sibirica* (широко распространен в Сибири и на Дальнем Востоке нашей страны); *R. sibirica subsp. BJ-90* (редко встречается на Дальнем Востоке) [3]. Однако на юге Хабаровского края в клещах *Haemaphysalis concinna* и от больных, имеющих сходные с СКТ клинические проявления (лихорадка, первичный аффект, образующийся на месте присасывания клеща, регионарный лимфаденит, розеолезно-папулезная полиморфная сыпь) была неоднократно выявлена риккетсия *R. heilongjiangensis* [8]. Ранее этот вид риккетсий был выделен из клещей *D. silvarum* и *H. concinna* в северной провинции Китая Хэйлуцзян, граничащей с Дальневосточными регионами России (Амурская и Еврейская автономные области, Хабаровский и Приморский край). Детекция ДНК *R. heilongjiangensis* в клинических образцах, полученных от больных в Китае и Японии, подтверждает факт патогенности этого вида риккетсий для человека [9, 10]. Таким образом, выделение *R. heilongjiangensis* из клещей, отловленных в Приморском, Хабаровском, Красноярском, Алтайском крае, в Иркутской области (в регионах эндемичных по клещевому риккетсиозу) с одной стороны, и выделение этого вида риккетсий от больных, имеющих типичную симптоматику, наблюдаемую при СКТ, с другой стороны, дает основание предполагать, что в РФ на территории Сибири и Дальнего Востока эта риккетсия может быть причастна к определенной части случаев заболевания людей, поступивших на лечение с диагнозом «клещевой риккетсиоз» [3, 4, 8, 11]. Предполагается, что *R. heilongjiangensis* может являться причиной порядка 300 случаев заболевания риккетсиозом в год на Дальнем Востоке [11]. Доктором Медяниковым О.Ю. предложено отдельное название для этого риккетсиоза группы КПЛ: «дальневосточный клещевой риккетсиоз» [12]. Как показано им же, для антигенов *R. sibirica* и *R. heilongjiangensis* характерна нерезко выраженная сывороточная перекрестная реакция, что не позволяет эффективно использовать существующие методы, основанные на выявлении антигена *R. sibirica*, для диагностики дальневосточного клещевого риккетсиоза. Следовательно, лабораторная диагностика данного заболевания у пациентов с соответствующими проявлениями требует разработки более специфичных методов.

Диагностика инфекций, переносимых клещами, предполагает анализ не только пациента, но и укусившего его клеща. Обнаружение того или иного инфекционного агента в клеще, после укуса которого пациент обратился в медицинское учреждение, позволяет своевременно назначить адекватную

превентивную терапию, а также помогает правильно определить заболевание при неясных клинических проявлениях. Для анализа клещей на присутствие возбудителей клещевых инфекций широко используется полимеразная цепная реакция (ПЦР). Успешно применяются ПЦР-наборы, позволяющие выявить как в клещах, так и в биоматериале от пациента таких инфекционных агентов, как боррелии, анаплазмы, эрлихии, вирус клещевого энцефалита и т.д. Однако в настоящее время в России отсутствуют зарегистрированные наборы реагентов для выявления нуклеиновых кислот патогенных риккетсий как в клещах, так и в биоматериале пациентов, пострадавших от присасывания клеща. Поскольку риккетсии могут быть обнаружены при микст-инфекциях совместно с другими возбудителями клещевых инфекций [13, 14, 15], в случае выявления последних внимание будет смещено на этих возбудителей, которым может быть ошибочно приписано заболевание, в действительности связанное с риккетсиями.

При разработке молекулярных тестов для рутинного выявления риккетсий необходимо учитывать следующие обстоятельства. С одной стороны, инфицированность клещей риккетсиями в эндемичных зонах может быть крайне высокой (так, по нашим данным, в сезон 2009 г. 75% иксодовых клещей, собранных в окрестностях Новосибирска, были инфицированы риккетсиями). С другой стороны, разнообразие видов риккетсий, обнаруживаемых в членистоногих на территории России, велико, но вопрос о том, какие виды риккетсий могут рассматриваться как патогенные, далек от разрешения. В этой связи выявление риккетсий в клеще без разделения вида может быть не рациональным. Следует также учитывать, что не исключено инфицирование одного клеща сразу несколькими видами риккетсий [16].

Нами проводится исследование, направленное на сбор и анализ информации о распространенности и видовой принадлежности риккетсий в клещах и крови укушенных пациентов в разных регионах России с целью рационального обоснования разработки молекулярных тестов, которые могли бы быть применены в диагностике клещевых риккетсиозов.

Материалы и методы

48 клещей *Haemaphysalis concinna* были отловлены в Магдагачинском районе Амурской области на флаг в июне 2011 г. Приготовление суспензий клещей осуществлялся с помощью гомогенизатора «MagNA Lyser» («Roche Diagnostics», Швейцария) и набора «Матрикс-К» для измельчения образцов (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск) [17]. Клещей диспергировали в 300 мкл раствора для приготовления образцов (РПО, производства ЗАО «Вектор-Бест»). 40 образцов сывороток были получены из крови больных, госпитализированных в стационар больницы г. Хабаровска с мая по август 2012 г. с диагнозом «клещевой риккетсиоз». Кровь забиралась при поступлении в острый период заболевания

и была анализирована на наличие антител к *R. sibirica* с помощью набора «Диагностикум риккетсиозный Сибирика для РСК» согласно инструкции производителя (НПО «Микроген»). После проведенных серологических исследований образцы сыворотки были заморожены и хранились при температуре -700°C . В анамнезе обследованных больных был отмечен факт присасывания клеща. Суммарную ДНК и РНК из 100 мкл сыворотки крови или 100 мкл суспензий клещей выделяли с помощью набора «РеалБест экстракция 100» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск).

Выявление ДНК боррелий, анаплазм, эрлихий и РНК ВКЭ проводили с помощью наборов «РеалБест ДНК *Borrelia miyamotoi*», «РеалБест ДНК *Borrelia burgdorferi s.l.*», «РеалБест ДНК *Anaplasma phagocytophilum/Ehrlichia muris, Ehrlichia chaffeensis*» и «РеалБест РНК ВКЭ» (ЗАО «Вектор-Бест»). Выявление ДНК риккетсий проводили с помощью разработанных нами лабораторных версий наборов «РеалБест ДНК *Rickettsia spp.*» (выявление участка гена *gltA*), «РеалБест ДНК *Rickettsia sibirica*» и «РеалБест ДНК *Rickettsia heilongjiangensis*», где в качестве мишени использовались участки гена *ompA*. Перечисленные наборы основаны на методе ПЦР с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Амплификацию ДНК и РНК проводили на термоциклере с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени «CFX96» («Bio-Rad», США). Видовую принадлежность риккетсий подтверждали секвенированием фрагментов генов риккетсий по Сэнгеру на автоматическом секвенаторе «ABI Prism 3100 DNA Analyser» («Applied Biosystems», США).

Результаты и обсуждение

Анализ клещей. Выделенные из суспензий клещей *H. concinna* образцы суммарной ДНК были подвергнуты скринингу с помощью набора «РеалБест ДНК *Rickettsia spp.*». Этот ПЦР-тест ориентирован для выявления участка гена *gltA*, который характеризуется низкой изменчивостью для ряда видов риккетсий группы КПЛ, циркулирующих на территории Российской Федерации. В 12 из 48 клещей (25%) была выявлена ДНК риккетсий. Помимо риккетсий, в проанализированных клещах не был выявлен ни один из инфекционных агентов, на наличие которых они были проанализированы. Дальнейший анализ этих суспензий клещей с помощью двух видоспецифичных тестов «РеалБест ДНК *Rickettsia sibirica*» и «РеалБест ДНК *Rickettsia heilongjiangensis*» по участкам гена *ompA* позволил установить, что все 12 образцов ДНК риккетсий принадлежат к виду *R. heilongjiangensis*. Полученные данные были подтверждены секвенированием наработанных с помощью внешних родоспецифичных праймеров фрагментов генов *gltA* и *ompA* длиной в 1150 и 315 п.н. соответственно. Отдельные районы используемых участков этих генов различаются по своей последовательности у разных видов риккетсий. Филогенетический анализ продук-

тов амплификации по обеим указанным генам подтвердил, что все положительные образцы содержат ДНК *R. heilongjiangensis*, в которых не наблюдается генетических вариаций. По нашим подсчетам, количество копий ДНК риккетсий в одной особи варьировало в пределах от $3,8 \times 10^5$ до 3×10^6 .

По данным доктора Медяникова О.Ю. процент инфицированности риккетсиями клещей *H. concinna*, выловленных в Хабаровском крае, составляет 28%, что совпадает с полученными нами данными инфицирования данного вида клещей в расположенной по соседству Амурской области. Выявление ДНК *R. heilongjiangensis* и специфических к ней антител у больных с признаками клещевого риккетсиоза на Дальнем Востоке свидетельствует о причастности именно этого вида риккетсий к заболеванию [8, 10].

Анализ сывороток пациентов, отмечавших присасывание клещей. С помощью метода ПЦР-РВ на наличие ДНК риккетсий нами был проведен ретроспективно анализ 40 сывороток, полученных из крови больных, госпитализированных в стационар больницы г. Хабаровска в 2012 г. с диагнозом клещевой риккетсиоз. Больные после присасывания клеща поступали на лечение в острый период заболевания с типичными клиническими признаками заболевания клещевой пятнистой лихорадки. В образцах 35 из 40 сывороток (87,5%) больных с помощью метода РСК, с использованием для реакции эфирно выделенных антигенных комплексов *R. sibirica*, были выявлены антитела к риккетсиям с титром от 1/10 до 1/40, что являлось серологическим подтверждением правильности предварительно поставленного диагноза заболевания «клещевой сыпной тиф». Только лишь у пяти больных специфические антитела не были выявлены. С помощью набора «РеалБест ДНК *Rickettsia spp.*» в трех образцах (7,5%) была выявлена ДНК риккетсий (в двух повторях). Использование двух видоспецифических тестов «РеалБест ДНК *Rickettsia sibirica*» и «РеалБест ДНК *Rickettsia heilongjiangensis*» помогло нам дифференцировать возбудителей. У двух больных была выявлена ДНК *R. sibirica*, у третьего ДНК *R. heilongjiangensis*. Секвенирование фрагмента гена *ompA* в этих образцах подтвердило видовую принадлежность выявленных в крови риккетсий. Выявление в сыворотке одного из больных ДНК *R. heilongjiangensis* и положительный результат, полученный на этой сыворотке с помощью РСК (титр 1/40), направленного на выявление антител к *R. sibirica*, свидетельствует о возможности видовой перекрестной реакции антител, что было опубликовано ранее [8, 12].

Таким образом, заболевания, вызванные разными видами риккетсий, но при этом имеющие неразличимые клинические проявления, по-видимому, невозможно дифференцировать с помощью серологического метода, используя антиген *R. sibirica*. При исследова-

ниях, проведенных в Хабаровске, отмечено, что при работе с сыворотками местных больных применение антигена *R. sibirica* в серологических исследованиях дает худшие результаты по сравнению с антигеном *R. heilongjiangensis* [12]. Поэтому актуальна разработка более специфичного серологического теста.

В проанализированной небольшой выборке клещей *H. concinna* нам не удалось обнаружить *R. sibirica*, тем не менее выявление нами этого вида риккетсии в крови двух больных из Хабаровска, свидетельствует о его циркуляции в этом регионе. Вполне возможно, что этот вид нужно искать не только в клещах рода *Dermacentor* или *Haemaphysalis*, но и в клещах рода *Ixodes*, которые также являются его резервуаром. Так отдельные случаи выявления *R. sibirica* в клещах *Ixodes persulcatus* отмечены в Новосибирской области и на Алтае [4].

Таким образом, нами продемонстрировано наличие патогенных для человека риккетсий как в клещах, так и в крови пациентов с диагнозом «клещевой риккетсиоз» на Дальнем Востоке. В некоторых случаях заболевание, трактуемое как КСТ, вызванный инфицированием *R. sibirica*, может в действительности представлять собой дальневосточный клещевой риккетсиоз, связанный с заражением пациента иным видом риккетсий – *R. heilongjiangensis*. Данный вид риккетсий широко распространен в клещах рода *Haemaphysalis* в данном регионе. В иных регионах и других видах клещей могут преобладать другие виды риккетсий. Так, как по нашим данным, так и по данным, полученным другими исследователями, инфицированность клещей рода *Ixodes* риккетсиями *R. raoultii* (вопрос о патогенности которой открыт) в отдельных природных очагах может достигать 80%. В то же время нами установлено, что в клещах *Ixodes*, отловленных в Новосибирской области, процент зараженности *R. tarasevichiae*, которая считается непатогенной, составляет более 40%. Следовательно, ПЦР-анализ клещей на присутствие ДНК риккетсий требует дифференцирования патогенных видов риккетсий от непатогенных (или тех, для которых патогенность не доказана). При этом выявления только *R. sibirica* может быть недостаточно, поскольку в значительном числе случаев заболевание, ошибочно определяемое как «КСТ, вызванный *R. sibirica*», может в действительности иметь иную этиологию.

Невысокий процент выявляемости ДНК риккетсий при ретроспективном анализе сывороток больных (7,5%) не может являться характеристикой возможностей метода ПЦР для диагностики КПЛ. Нужно учитывать ряд факторов, влияющих на концентрацию возбудителя в данном типе образца. Во-первых, на начальной стадии заболевания, когда у пациентов начинается повышение температуры, а другие клинические признаки еще не проявлены, больные часто прибегают к самолечению, начинают принимать как антипиретики, так и антибиотики, что существенным образом подавляет и так небольшое количество возбудителя в крови, который находится там транзиторно и короткое время, стремясь как можно быстрее поразить мишень, которой являются клетки эндотелия сосудов. Во-вторых,

часто, при поступлении пациента в стационар и при появлении ряда признаков заболевания врач уже сам назначает антибиотикотерапию, тем самым опережая утренний забор крови у больного. Даже однократное применение препарата значительно снижает количество возбудителя в крови. В-третьих, сыворотка – это бактериально обедненный клинический материал, так как значительная часть возбудителя не попадает в жидкую фазу, а оседает на дно вместе со сгустком крови при центрифугировании. Использование для ПЦР-анализа других типов проб (лейкоцитарная фракция, полученная из цельной крови, биоптат, взятый с места первичного аффекта или смывы с него с помощью стерильного тампона, смоченного в физрастворе) либо работа с большим количеством сыворотки, чем 100 мкл (например, с помощью производимого ЗАО «Вектор-Бест» набора «РеалБест экстракция 1000») может значительно повысить вероятность выявления возбудителя КПЛ у больного.

В целом, при должной оптимизации обнаружение фрагментов ДНК, специфичных для риккетсий, в кляксах и клинических образцах молекулярно-генетическими методами может рассматриваться в качестве актуального вспомогательного метода лабораторной диагностики заболеваний группы КПЛ. Подобные методы при анализе проб от пациентов имеют относительно низкую отрицательную предсказательную ценность (что связано с невысоким содержанием риккетсий в крови пациентов при заболевании), однако их положительная предсказательная ценность должна быть высокой благодаря специфичности метода ПЦР, превосходящей специфичность серологических методов. Учитывая ограниченность возможностей доступных реагентов для лабораторной диагностики риккетсиозов и эпидемиологического надзора над ними, разработка новых диагностикумов представляется безусловно актуальной.

Список литературы находится в редакции

ЛИМФА-2014
НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

19-20 ноября 2014

ЛИМФОЛОГАМ:

- научная конференция и живое общение
- мастер-классы от ведущих специалистов

ВРАЧАМ ДРУГИХ СПЕЦИАЛЬНОСТЕЙ (ТЕРАПЕВТАМ, ОНКОЛОГАМ, ПЕДИАТРАМ и т.д.):
300 000 000 человек в мире страдают от лимфедемы (лимфостаза), а 95% врачей не знают, что это такое или как помочь такому пациенту. Мы расскажем вам все, что должен знать врач (диагностика, эффективное лечение и профилактика для специалистов и новичков).

Зарегистрируйтесь на сайте www.лимфа2014.рф и примите участие в конференции бесплатно.*

* - после регистрации Вас ждет подарок