

Возможности ранней лабораторной диагностики клещевых нейроинфекций: клещевого энцефалита и Лайм-боррелиоза

Марьина Н.М., Шетекаури С.А., Ольховский И.А.

Opportunities of early laboratory diagnostics of tick-borne neuroinfections: tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis

Mar'ina N.M., Shetekauri S.A., Olchovsky I.A.

Красноярская государственная медицинская академия, г. Красноярск

© Марьина Н.М., Шетекаури С.А., Ольховский И.А.

Необходимость лабораторного подтверждения клещевого энцефалита (КЭ) и Лайм-боррелиоза (ЛБ) не вызывает сомнения. Цель исследования — изучение возможностей иммуноферментного анализа (ИФА) и полимеразной цепной реакции (ПЦР) для ранней диагностики КЭ и ЛБ. В исследовании показано, что наличие микст-инфекции у больного не влияет на возможность выявления соответствующих возбудителей методами ИФА и ПЦР в раннем периоде заболевания. Для ранней лабораторной диагностики очаговых и менингеальных форм КЭ наиболее информативно выявление иммуноглобулина М в сыворотке крови. Наибольшую информативность для диагностики раннего нейроборрелиоза показало исследование ликвора больных методом ПЦР. Комбинация методов ИФА и ПЦР увеличивает эффективность ранней лабораторной диагностики очаговых и менингеальных форм КЭ и ЛБ.

Diagnostics of tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis is possible only by laboratory confirmation. The purpose of the investigation was the study of possibilities of immunoferment analysis and polymerase chain reaction for early diagnostics of these infections. It was revealed that mixinfection of patient does not influence on revelation of infectious agent by immunoferment analysis and polymerase chain reaction in the early period of disease. For initial diagnostics of focal and meningeal forms of tick-borne neuroinfections, revelation IgM in blood serum is the most informative. The investigation of patient liquor by the method of polymerase chain reaction is the most available for diagnostics of early neuroborreliosis. The combination of methods (immunoferment analysis and polymerase chain reaction) increases the effectiveness of early laboratory diagnostics of focal and meningeal forms of tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis.

Введение

Среди заболеваний, передающихся через укус клеща, наибольшую актуальность для здравоохранения России имеют клещевые нейроинфекции (КНИ): клещевой энцефалит (КЭ) и иксодовый клещевой боррелиоз (Лайм-боррелиоз (ЛБ)) [3, 8, 9]. Широкая распространенность, а также нерешенность многих вопросов диагностики, лечения и профилактики КНИ обуславливают все больший интерес исследователей к этим заболеваниям.

Нозоареалы этих инфекций практически совпадают. Приурочены они главным образом к лесным ландшафтам умеренного климатического пояса [5, 6, 15]. Клинические проявления варьируют от легких лихорадочных до тяжелых очаговых форм [4, 6, 7, 15]. Наряду с клиническим полиморфизмом КЭ и ЛБ имеют ряд сходных между собой и другими инфекциями симптомов, особенно в ранний период, что существенно ограничивает возможность их дифференциаль-

ной диагностики. Кроме того, общность переносчиков способствует одновременному инфицированию человека разными геновидами боррелий и вирусами КЭ с последующим развитием микст-инфекции [1, 11]. Этиологическая диагностика КНИ, а также их дифференциально-диагностическое разграничение между собой возможны только путем лабораторного подтверждения. Однако лабораторная диагностика проблематична, так как в настоящее время нет методик, подтверждающих диагноз КНИ на 100%. Поэтому существует необходимость расширения методов верификации диагноза и их дальнейшее изучение.

Цель исследования — изучение возможностей иммуноферментного анализа (ИФА) и полимеразной цепной реакции (ПЦР) для ранней диагностики КЭ и ЛБ.

Материал и методы

В настоящей работе проанализированы 65 клинических наблюдений (20 женщин и 45 мужчин) с КНИ за период с

2003 по 2005 г. Отбор больных осуществлялся по мере их поступления в специализированные стационары г. Красноярска. Госпитализация пациентов была обоснована возникновением температурной реакции, явлений интоксикации и неврологической симптоматики в эпидсезон, после нападения клеща или пребывания в эпидочаге.

Для проверки достоверности методов лабораторного исследования была набрана контрольная группа из 18 пациентов. В эту группу вошли пациенты в возрасте от 15 до 78 лет с неотягощенным анамнезом по КНИ, поступившие в неврологические отделения вне периода эпидемического сезона.

На основании клинико-лабораторных данных в выборке клинических наблюдений были выделены три группы: больные с клещевым энцефалитом, Лайм-боррелиозом и сочетанием КЭ и ЛБ у одного больного — микст-инфекцией (МИ) (табл. 1).

Таблица 1
Распределение больных по группам

Группа	Количество больных	%
КЭ	18	27,69
ЛБ	9	13,85
МИ	38	58,46
Всего	65	100

У пациентов всех групп клинических наблюдений отмечались неврологические синдромы диффузного или очагового поражения ЦНС и (или) менингеальные синдромы.

Возраст пациентов в выборке варьировал от 15 до 76 лет. Статистически значимых различий по возрасту и полу между группами не выявлено.

Для лабораторной диагностики с целью раннего выявления КНИ (КЭ, ЛБ) были выбраны лабораторные методы ИФА и ПЦР [2, 9, 12—14]. Больным КНИ и пациентам контрольной группы проводилось исследование крови на выявление ранних специфических антител класса иммуноглобулина М (IgM) методом ИФА. Параллельно исследовались кровь и ликвор на выявление нуклеиновых кислот возбудителей методом ПЦР. Исследования проводились в течение первых 5 дней от момента клинической манифестации заболевания.

Анализы проведены по стандартизированным методикам в лицензированных лабораториях краевого центра «АнтиС-ПИД». Выявление специфических антител классов IgM к возбудителям КЭ и ЛБ методом ИФА в сыворотке крови пациентов осуществлялось на иммуноферментном анализаторе WAMS-2 фирмы «BioRad» с применением тест-систем «Век-

тоВКЭ-IgM-стрип» (ЗАО «ВекторБест», г. Кольцово, Новосибирская обл.), «Anti-Borrelia ELISA (IgM)» (Германия).

Детекцию РНК вируса КЭ в крови и ликворе проводили в ПЦР-лаборатории методом обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР) с использованием тест-системы «ВектоВКЭ-РНК-ампли-20» (ЗАО «ВекторБест»). Для ПЦР-диагностики ЛБ в крови и ликворе применялась тест-система «Набор реагентов для обнаружения ДНК боррелий методом полимеразной цепной реакции» производства ООО «ИзоГен» (г. Москва).

Статистическая обработка результатов производилась с использованием общепринятых методов статистического анализа [10].

Результаты и обсуждение

Ложноположительных результатов ИФА (IgM) в контрольной группе не выявлено. Ранние антитела класса IgM к *Borrelia burgdorferi* s.l. были обнаружены в группе больных ЛБ в 3 (33,33%) случаях, в группе МИ — в 10 (27,03%) случаях. Выявление IgM к вирусу КЭ отмечалось в группе КЭ в 11 случаях (61,11%), в группе МИ — в 29 (78,38%) случаях.

Исследование контрольной группы методом ПЦР выявило ДНК боррелий в крови 1 (5,56%) пациента. При сравнении контрольной группы с группами ЛБ (44,44%) и МИ (37,84%) по данному показателю выявлены статистически значимые различия ($p < 0,05$). Данный результат расценен как ложноположительный. Таким образом, достоверность метода оказалась высокой и составила 94,44%. Результаты детекции ДНК боррелий и РНК вируса КЭ методом ПЦР в сыворотке крови и ликворе пациентов исследуемых групп представлены в табл. 2, 3.

Таблица 2
Результаты ПЦР-диагностики Лайм-боррелиоза
(количество положительных проб), абс. (%)

Группа	Кровь	Ликвор
ЛБ	4 (44,44)	7 (77,78)
МИ	14 (37,84)	28 (73,68)

Таблица 3
Результаты ПЦР-диагностики клещевого энцефалита
(количество положительных проб), абс. (%)

Группа	Кровь	Ликвор
КЭ	4 (22,22)	4 (22,22)
МИ	17 (45,95)	11 (28,95)

Сравнения групп ЛБ и МИ по показателям обнаружения IgM к боррелии и выявления ее ДНК, а также сравнение групп КЭ и МИ по показателям обнаружения IgM к вирусу КЭ и вирусной РНК статистически значимых различий в этих

группах не выявили. Данный факт позволил объединить группы ЛБ в сочетании с МИ и КЭ в сочетании с МИ для дальнейшего изучения возможностей ранней лабораторной диагностики исследуемых КНИ.

На основании полученных результатов проведен расчет и анализ эмпирической вероятности выявления КЭ и ЛБ при применении различных методик и их комбинации ($p < 0,05$). Полученные показатели представлены в табл. 4, 5.

Таблица 4

Эмпирическая вероятность выявления ЛБ различными методами диагностики

Показатель	ИФА (IgM)	ПЦР (кровь)	ПЦР (ликвор)	Все методы
Коэффициент вероятности	0,28	0,39	0,74	0,89

Таблица 5

Эмпирическая вероятность выявления КЭ различными методами диагностики

Показатель	ИФА (IgM)	ПЦР (кровь)	ПЦР (ликвор)	Все методы
Коэффициент вероятности	0,73	0,38	0,27	0,88

Из приведенных данных видно, что для ранней лабораторной диагностики очаговых и менингеальных форм КЭ наиболее информативен метод ИФА — эмпирическая вероятность равна 0,73 (73%). Исследование сыворотки крови и ликвора методом ПЦР позволяет диагностировать заболевания в 38 и 27% соответственно. Наибольшую информативность для диагностики раннего нейроборрелиоза показал метод выявления ДНК боррелии (ПЦР) в ликворе больных — эмпирическая вероятность 0,76 (76%), в то время как возможность детекции боррелий в сыворотке крови методом ПЦР и ИФА на выявление IgM к боррелии составили 39 и 28% соответственно. Однако совместное применение всех трех методик увеличивает возможность раннего выявления возбудителя до 88% при КЭ и до 89% при ЛБ. Кроме того, следует отметить, что применение ПЦР для исследования ликвора имеет большую значимость для дифференциальной диагностики этиологически разных сезонных менингитов, что имеет существенное значение в практике клиницистов, так как тактика лечения их различна.

Таким образом, настоящее исследование показало, что наличие микст-инфекции (КЭ и ЛБ) у больного не влияет на возможность выявления соответствующих возбудителей методами ИФА и ПЦР. Комбинация современных серологических и молекулярно-генетических методов (ИФА и ПЦР) зна-

чительно увеличивает эффективность ранней лабораторной диагностики очаговых и менингеальных форм КНИ.

Литература

1. Алексеев А.Н., Дубинина Е.В., Вашукова М.А. и др. Боррелии как вероятные антагонисты вируса клещевого энцефалита: паразитологический и клинический аспекты проблемы // Мед. паразитол. и паразитарные болезни. 2001. № 3. С. 3—11.
2. Базарный В.В., Коринова М.Ю., Иолкова Л.И. и др. // Клиническая лабораторная диагностика. 2003. № 12. С. 49—50.
3. Горин О.З., Злобин В.И., Арбатская Е.В. и др. Актуальные проблемы эпидемиологии и профилактики трансмиссивных инфекций Сибири // Вирус., риккетсиоз. и бактериал. инфекции, переносимые клещами: Тез. докл. междунар. науч. конф. Иркутск, 1996. С. 8—10.
4. Деконенко Е.П., Курпирянова Л.В., Рудометов Ю.П. и др. Основные формы поражений нервной системы при Лайм-боррелиозе // Невролог. журн. 2001. № 5. С. 9—12.
5. Злобин В.И. Современные аспекты эпидемиологии клещевого энцефалита // Эпидемиологическая обстановка и стратегия борьбы с клещевым энцефалитом на современном этапе: Матер. пленума «Клещевой и другие вирусные энцефалиты» РАМН. М., 2003. С. 7—9.
6. Иерусалимский А.П. Клещевой энцефалит. Новосибирск, 2001. 360 с.
7. Лобзин Ю.В., Рахманова А.Г., Антонов В.С. и др. Эпидемиология, этиология, клиника, диагностика, лечение и профилактика иксодовых клещевых боррелиозов: Рекомендации для врачей. СПб., 2000. 28 с.
8. Онищенко Г.Г. Заболеваемость клещевым энцефалитом в Российской Федерации // Эпидемиолог. обстановка и стратегия борьбы с клещевым энцефалитом на современном этапе: Матер. пленума «Клещевой и другие вирусные энцефалиты» РАМН. М., 2003. С. 5—6.
9. Офицеров В.И. Лайм-боррелиоз и его диагностика // Новости «Вектор-Бест». 2003. № 2 (28). С. 4—7.
10. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. М., 2003. 305 с.
11. Семенов В.А. Клиническая характеристика смешанной энцефалитно-боррелиозной инфекции у взрослых в Кемеровской области // Вестн. ВолГМУ. 2005. № 2 (14). С. 64—66.
12. Фоменко Н.В., Романова Е.В., Мельникова О.В. и др. Детекция ДНК боррелий комплекса *Borrelia burgdorferi* sensu lato в крови больных иксодовыми клещевыми боррелиозами // Клинич. лаб. диагностика. 2006. № 8. С. 35—37.
13. Черныцына Л.О., Епихина Т.И., Липатникова С.В. и др. Использование в клинической практике выявления РНК вируса клещевого энцефалита методом ПЦР для диагностики острых и хронических форм клещевого энцефалита // Актуал. проблемы природ.-очаг. инфекций. Ижевск, 1998. С. 224—227.
14. DeBiasi R.L., Tyler K.L. Molecular Methods for Diagnosis of Viral Encephalitis // Clinical Microbiology Reviews. 2004. V. 17. № 4. Oct. P. 903—925.
15. Oschmann P., Kraiczy P., Halperin J. et al. Lyme borreliosis and Tick-Borne Encephalitis. I. Auflage. Bremen: UNI-MED, 1999. 144 p.