

Выявление антител к возбудителям гранулоцитарного анаплазмоза и моноцитарного эрлихиоза человека в крови пациентов из Новосибирской области

Рар В.А.¹, Фоменко Н.В.¹, Мельникова О.В.², Черноусова Н.Я.²

Detection of antibodies against agents of human granulocytic anaplasmosis and human monocytic ehrlichiosis serum from patients from Novosibirsk Region

Rar V.A., Fomenko N.V., Mel'nikova O.V., Chernousova N.Ya.

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск

² Муниципальная инфекционная клиническая больница № 1, г. Новосибирск

© Рар В.А., Фоменко Н.В., Мельникова О.В., Черноусова Н.Я.

На наличие антител к возбудителям гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ) и моноцитарного эрлихиоза человека (МЭЧ) были исследованы образцы крови пациентов, госпитализированных с признаками инфекционных заболеваний и присасыванием клещей в анамнезе. У 10 из 205 лихорадящих пациентов были выявлены антитела к возбудителю ГАЧ, у 1 — к возбудителю МЭЧ и у 1 — к возбудителям ГАЧ и МЭЧ. У 4 из 12 серопозитивных пациентов диагноз ГАЧ являлся серологически и клинически подтвержденным. У всех пациентов с серологически подтвержденным ГАЧ одновременно выявлялись антитела к *Borrelia burgdorferi* sensu lato или к возбудителю МЭЧ, у 1 пациента был также диагностирован клещевой энцефалит (КЭ). Таким образом, представляется целесообразным проводить выявление возбудителя ГАЧ и МЭЧ у пациентов как с подтвержденным диагнозом КЭ, так и с лихорадками неясного генеза.

Serum samples from patients hospitalized with febrile illnesses occurring after tick bites were investigated for antibodies against agents of human granulocytic anaplasmosis (HGA) and human monocytic ehrlichiosis (HME). Ten from 205 patients were shown to contain HGA-specific antibodies, one patient — HME-specific antibodies, and one patient — both antibodies against agents of HGA and HME. Diagnosis of HGA was serologically and clinically confirmed for four patients. All patients with serologically confirmed HGA were shown to contain also antibodies against *Borrelia burgdorferi* sensu lato or HME-specific antibodies. Moreover, one patient was shown to be infected with tick-borne encephalitis virus. Thus, it seems reasonable to analyze patients with confirmed tick-borne encephalitis as well as with febrile illness after tick bites on the infection with HGA and HME.

Введение

Широко распространенные в Новосибирской области таежные клещи *Ixodes persulcatus* являются переносчиками вируса клещевого энцефалита и боррелий комплекса *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.). Кроме того, в таежных клещах выявлены внутриклеточные грамотрицательные бактерии *Anaplasma phagocytophilum*, являющиеся инфекционным агентом гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ), и моноцитарные эрлихии *Ehrlichia muris*, филогенетически схожие с возбудителем моноцитарного эрлихиоза человека (МЭЧ) *Ehrlichia chaffeensis* [6, 11, 13]. Выявление у людей в эндемичных по клещевым инфекциям регионах антител к моноцитарным эрлихиям позволило ряду исследователей предположить, что *E. muris* также может являться этиологи-

ческим агентом МЭЧ [12], однако прямых доказательств патогенности *E. muris* до настоящего времени не получено.

ГАЧ широко распространен в США, где до 2004 г. было отмечено более 2,5 тыс. случаев заболевания, в Европе зарегистрировано около 70 случаев заболевания [9, 14]. На территории Новосибирской области *A. phagocytophilum* обнаружены в 2,4% таежных клещей и в 4,2% образцов крови мелких млекопитающих [2]. Выявление *A. phagocytophilum* в клещах и мелких млекопитающих свидетельствует о потенциальной опасности инфицирования людей. Постановку диагноза затрудняет отсутствие специфичных признаков заболевания. У больных наблюдаются острая лихорадка, сильная головная и мышечная боль, тошнота, в ряде случаев

сыпь. В большинстве случаев у больных ГАЧ отмечают лейкопению, тромбоцитопению, а также повышенный уровень аминотрансфераз печени и С-реактивного белка в сыворотке крови [10, 14]. Чаще всего диагноз ГАЧ ставят с использованием серологических методов. В Европе и США диагноз считается подтвержденным, если у больных с клиническими симптомами заболевания и присасыванием клещей в анамнезе наблюдается сероконверсия или возрастающий не менее чем в 4 раза титр антител в парных сыворотках, а также в случае изоляции возбудителя на питательные среды или при подтвержденном секвенировании выявления ДНК *A. phagocytophilum* [10].

Несмотря на малое число людей, перенесших ГАЧ (во всех странах, кроме США), число людей с серопозитивными сыворотками достаточно велико. В европейских странах у 2—30% людей были выявлены антитела к *A. phagocytophilum*, в США — у 11—15%, в Монголии — у 2—5% [7, 14, 15]. В России первый случай ГАЧ был зарегистрирован в 2000 г. на Дальнем Востоке [4], серологически подтвержденные случаи ГАЧ отмечены также на территории Пермской, Новосибирской областей и на Алтае [3, 8]. Антитела к гранулоцитарным анаплазмам были обнаружены у 3% госпитализированных после присасывания клещей пациентов в Иркутской области и у 16% — в Пермской области [1, 8]. Такой высокий уровень серопозитивности, как предполагают, может быть обусловлен бессимптомными случаями заболевания либо инфицированием людей непатогенными штаммами. Низкие титры антител могут быть также обусловлены неспецифической перекрестной реакцией [7, 9].

Целью работы являлось изучение возможного участия возбудителей ГАЧ и МЭЧ в патогенезе переносимых клещами инфекций на территории Новосибирской области.

Материал и методы

Сбор сывороток

Была собрана коллекция сывороток крови пациентов муниципальной инфекционной клинической больницы № 1 г. Новосибирска, госпитализированных в мае — июле 2007 г. с признаками инфекционных заболеваний после присасывания клещей. Были собраны как первые сыворотки, взятые в первые дни после госпитализации (1—11-й дни после начала заболевания), так и повторные сыворотки (через 6—14 дней после взятия первых сывороток). У ряда пациентов были также собраны сыворотки, взятые в более поздние

сроки (2—3 мес после начала заболевания). В качестве контрольной группы были использованы сыворотки людей, отрицающих присасывание клещей в последние 3 года.

Выявление антител к возбудителям ГАЧ и МЭЧ

Методом иммуноферментного анализа (ИФА) были исследованы сыворотки на наличие в них иммуноглобулинов (Ig) M и G к возбудителям ГАЧ и МЭЧ с применением рекомбинантных тест-систем «ГАЧ-ИФА-IgM», «ГАЧ-ИФА-IgG», «МЭЧ-ИФА-IgM» и «МЭЧ-ИФА-IgG» производства ООО «Омникс» (г. Санкт-Петербург) в соответствии с инструкцией производителя. Для первоначального анализа использовались сыворотки в разведении 1:100. Положительные сыворотки были дополнительно изучены в последовательных серийных разведениях в 2 раза.

Наличие антител к *B. burgdorferi* s.l. было исследовано при проведении реакции непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ) как ранее описано [5], а также методом ИФА с использованием рекомбинантной тест-системы «Боррелиоз-ИФА-Скрининг» (ООО «Омникс»).

Результаты и обсуждение

На наличие антител к возбудителям ГАЧ и МЭЧ были исследованы парные сыворотки крови 205 пациентов с лихорадочным состоянием и присасыванием клещей в анамнезе, а также сыворотки 92 человек контрольной группы, отрицавших присасывание клещей. В группе лихорадящих больных антитела к возбудителю ГАЧ были обнаружены у 10 пациентов, антитела к возбудителю МЭЧ — у 1 пациента и антитела к возбудителям ГАЧ и МЭЧ — у 1 пациента. Антитела к моноцитарным эрлихиям относились к классу IgG, а антитела к гранулоцитарным анаплазмам — как к классу IgM, так и к классу IgG. В контрольной группе пациентов только в 1 из 92 сывороток были обнаружены антитела класса IgG к возбудителю ГАЧ с титром 1:100 (табл. 1).

Таблица 1
Выявление антител к возбудителям ГАЧ и МЭЧ

Антитела к возбудителям ГАЧ и МЭЧ	Число положительных (число исследованных сывороток)	
	Контрольная группа	Пациенты с лихорадочными состояниями
ГАЧ – IgG	—	5 (205)
ГАЧ – IgM	1 (92)	4 (205)
ГАЧ – IgG + ГАЧ – IgM	—	1 (205)
МЭЧ – IgG	—	1 (205)
ГАЧ – IgG + МЭЧ – IgG	—	1 (205)
Всего	1 (92)	12 (205)

У 3 из 12 серопозитивных пациентов наблюдалась сероконверсия антител и у 1 пациента — возрастающий в 8 раз титр антител в парных сыворотках (табл. 2). У остальных 8 пациентов титры антител были постоянными или различались в 2 раза (табл. 3). В соответствии с принятыми критериями [10] лишь в 4 случаях диагноз ГАЧ являлся серологически подтвержденным.

В табл. 2 представлены серологически подтвержденные случаи заболевания.

Пациент 1-1, 70 лет, наблюдались острая лихорадка с температурой 39,5 °С на 20-й день после присасывания клеща, головная боль, тошнота. Первая сыворотка отрицательная, во второй сыворотке обнаружены антитела класса IgG к возбудителям ГАЧ (1 : 800) и МЭЧ (1 : 400).

Таблица 2

Титры антител к возбудителям ГАЧ и МЭЧ у пациентов с серологически подтвержденным анаплазмозом

Пациент	Показатель крови		День с начала болезни	Титры антител IgM (IgG)		КЭ, особые симптомы	Титры антител к <i>B. burgdorferi</i> s.l.
	Leu, Tr	Аминотрансферазы (норма)		ГАЧ	МЭЧ		
1-1	Leu 2,3 Tr 98	Не см.	5	— (—)	— (—)		—
			13	— (1 : 800)	— (1 : 400)		
			62	— (1 : 200)	— (1 : 200)		
1-2	Leu 1,7 Tr 143	Не см.	5	— (1 : 200)	—	КЭ	1 : 800 ²⁾
			12	— (1 : 1600)	—		
1-3	Leu 3,4 Tr 127	АСТ 115 (34) ALT 81 (43)	6	— (—)	—	Сыпь	1 : 320 ¹⁾
			14	1 : 200 (—)	—		
1-4	Leu 3,1 Tr 145	Не см.	4	— (—)	—		1 : 160 ¹⁾
			11	1 : 200 (—)	—		
			92	— (—)	—		

Примечание. Здесь и в табл. 3: Leu — лейкоциты; Tr — тромбоциты; АСТ — аспартатаминотрансфераза; ALT — аланинаминотрансфераза; 1) — результаты РНИФ; 2) — результаты ИФА.

Таблица 3

Титры антител к возбудителям ГАЧ и у пациентов с постоянными титрами антител

Пациент	Показатель крови		День с начала болезни	Титры антител IgM (IgG) к возбудителю		КЭ, особые симптомы	Титры антител к <i>B. burgdorferi</i> s.l.
	Leu, Tr	Аминотрансферазы (норма)		ГАЧ	МЭЧ		
2-1	Leu 8,5 Tr 131	Не см.	11	1 : 100 (1 : 100)	—	Эритема	1 : 800 ²⁾
			21	1 : 200 (1 : 200)	—		
2-2	Leu 5,0 Tr 129	Не см.	2	1 : 400 (—)	—		1 : 320 ¹⁾
			13	1 : 400 (—)	—		
2-3	Leu 5,8 Tr 229	Не см.	9	1 : 200 (—)	—		—
			13	1 : 200 (—)	—		
			111	1 : 200 (—)	—		
2-4	Leu 7,8 Tr 135	Не см.	1	— (1 : 200)	—		1 : 160 ¹⁾
			11	— (1 : 400)	—		
			57	— (1 : 400)	—		
2-5	Leu 3,9 Tr 138	Не см.	1	— (1 : 200)	—		1 : 80 ¹⁾
			7	— (1 : 400)	—		
2-6	Не см.	Не см.	3	— (1 : 100)	—	КЭ	—
			14	— (1 : 100)	—		
2-7	Leu 5,1 Tr 143	Не см.	1	— (1 : 100)	—		1 : 640 ¹⁾
			8	— (1 : 100)	—		
2-8	Leu 1,7 Tr 167	АСТ 27,3 (34) ALT 10,3 (43)	1	—	— (1 : 100)		—
			7	—	— (1 : 100)		

Антитела выявлялись спустя 2 мес после начала заболевания. На 3-й день болезни у пациента отмечена значительная лейкопения (WBC 2,3) и тромбоцитопения (PLT 98), на 11-й день болезни показатели крови нормализовались (WBC 5,7; PLT 217).

Пациент 1-2, заболел на 16-й день после присасывания клеща на территории Бурятии. У больного отмечена слабость, головная боль, рвота, температура 37,5 °С на фоне приема жаропонижающих. У пациента обнаружены антитела класса IgG к возбудителю ГАЧ с титром 1 : 1600, при этом

титр антител с 5-го по 12-й день болезни увеличился в 8 раз. На 3-й день болезни наблюдалась значительная лейкопения (WBC 1,7) и умеренная тромбоцитопения (PLT 143), на 5-й день болезни показатели крови улучшились (WBC 2,5; PLT 173).

У пациента также была отмечена лихорадочная форма КЭ и выявлены антитела к *B. burdorferi* s.l.

Пациент 1-3, 36 лет, наблюдалась острая лихорадка с температурой 39,0 °C на 11-й день после присасывания клеща, головная боль, на 7-й день болезни необильная крупнопятнистая папулезная сыпь. Первая сыворотка отрицательная, во второй сыворотке выявлены антитела класса IgM к возбудителю ГАЧ (1:200). На 6—8-й день болезни отмечена умеренная лейкопения (WBC 3,4) и тромбоцитопения (PLT 127). У пациента наблюдался повышенный в 2—3 раза уровень аминотрансфераз. У больного также выявлены антитела к *B. burdorferi* s.l.

Пациент 1-4, 60 лет, наблюдалась острая лихорадка с температурой 39,7 °C на 18-й день после присасывания клеща. Первая сыворотка отрицательная, во второй сыворотке выявлены антитела класса IgM к возбудителю ГАЧ (1:200). В сыворотке, взятой через 3 мес после начала заболевания, антител к возбудителю ГАЧ не обнаружено. На 3-й день болезни у пациента отмечена умеренная лейкопения (WBC 3,1) и тромбоцитопения (PLT 145), на 11-й день болезни показатели крови нормализовались (WBC 5,1, PLT 241). У пациента также выявлены антитела к *B. burdorferi* s.l. (см. табл. 2)

Таким образом, во всех рассмотренных случаях у пациентов с серологически подтвержденным ГАЧ в острой фазе болезни наблюдались изменения в гематограмме (лейкопения, тромбоцитопения), характерные для данного заболевания. При этом показатели крови в течение 8 дней приходили в норму. У 3 из 4 пациентов имела место острая лихорадка с температурой 39,0—39,7 °C, у 1 пациента была отмечена сыпь и повышенный уровень аминотрансфераз. Титры антител класса IgG достигали показателей 1:800 — 1:1600, а титры антител класса IgM были существенно ниже (1:200), клинические симптомы заболевания были более ярко выражены у пациентов с антителами класса IgG.

Следует отметить, что ГАЧ не был обнаружен в виде моноинфекции. У всех пациентов с серологически подтвержденным ГАЧ были также выявлены антитела к возбудителю МЭЧ (1 пациент) или к *B. burdorferi* s.l. (3 пациента). Кроме того, у 1 пациента наряду с антителами к возбудителю

ГАЧ и к *B. burdorferi* s.l. была отмечена лихорадочная форма клещевого энцефалита.

Среди 8 пациентов с постоянными титрами антител у 1 были обнаружены антитела класса IgG к возбудителю МЭЧ и у 7 — антитела классов IgM и IgG к возбудителю ГАЧ (табл. 3). Следует отметить, что в данной группе пациентов титры антител не превышали 1:400. При этом в отличие от пациентов с серологически подтвержденным ГАЧ лишь у 2 из 8 пациентов с постоянными титрами антител наблюдалась лейкопения (пациенты 2-5 и 2-8). Незначительная тромбоцитопения наблюдалась у 4 из 8 пациентов. У 2 пациентов на наличие антител были исследованы сыворотки, взятые через несколько месяцев после начала заболевания. В третьих сыворотках определены антитела с теми же титрами, что и во вторых сыворотках: у пациента 2-4 класса IgG, а у пациента 2-3 класса IgM. Таким образом, у пациента 2-3 на протяжении почти 4 мес выявлялись антитела класса IgM с титром 1:200, что, вероятней всего, обусловлено наличием неспецифической перекрестной реакции (табл. 3)

Полученные результаты подтверждают данные из различных регионов о высоком уровне серопозитивности. Действительно, у 7 (3,5%) из 205 пациентов были обнаружены антитела к гранулоцитарным анаплазмам, не связанные, по всей видимости, с развитием инфекции. Можно предположить, что наличие постоянного титра антител обусловлено более ранним контактом с возбудителем ГАЧ. Наличие неспецифической перекрестной реакции, вероятно, не вносит существенного вклада в уровень серопозитивности, так как антитела к возбудителю ГАЧ были выявлены лишь в 1 из 92 сывороток от не контактировавших с клещами людей.

Таким образом, около 2% случаев острых лихорадочных состояний, возникающих после присасывания клеща, могут быть верифицированы как случаи ГАЧ и (или) МЭЧ. Представляется целесообразным проводить выявление возбудителя ГАЧ и МЭЧ у пациентов как с подтвержденным диагнозом КЭ, так и с лихорадками неясного генеза.

Литература

1. Козлова И.В., Злобин В.И., Верхозина М.М. и др. Результаты рекогносцировочных исследований по оценке эпидемиологической ситуации по моноцитарному эрлихиозу и гранулоцитарному анаплазмозу человека в Прибайкалье // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. № 3 (Прил.). 2007. С. 112—116.
2. Рар В.А., Ливанова Н.Н., Панов В.В. и др. Изучение генетического разнообразия анаплазм и эрлихий в паразитарных системах юга Западной Сибири и Урала // Бюл. сиб. медицины. 2006. Прил. 1. С. 116—120.
3. Рудаков Н.В., Шпынов С.Н., Самойленко И.Е. и др. Современ-

- ные подходы к изучению *Rickettsiales* // Бюл. сиб. медицины. 2006. Прил. 1. С. 111—115.
4. Сидельников Ю.Н., Медяников О.Ю., Иванов Л.И., Здановская Н.И. Первый случай гранулоцитарного эрлихиоза на Дальнем Востоке Российской Федерации // Клинич. медицина. 2003. № 81. С. 67—68.
 5. 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. № 7. С. 35—37.
 6. Шпынов С.Н., Рудаков Н.В., Ястребов В.К. и др. Новые данные о выявлении эрлихий и анаплазм в иксодовых клещах в России и Казахстане // Мед. паразитология. 2004. № 2. С. 10—14.
 7. Aguero-Rosenfeld M.E., Donnarumma L., Zentmaier L. et al. Sero-prevalence of antibodies that react with *Anaplasma phagocytophila*, the agent of human granulocytic ehrlichiosis, in different populations in Westchester County, New York // J. Clin. Microbiol. 2002. № 40. P. 2612—2615.
 8. Afanasieva M.V., Vorobyeva N.N., Korenberg E.I., Frizen V.I. Human granulocytic anaplasmosis: risk in the Cisural region, Russia // Int. J. Med. Microbiol. 2006. № 296. Suppl. 1. P. 167—168.
 9. Bakken J.S., Dumler J.S. Clinical diagnosis and treatment of human granulocytotropic anaplasmosis // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2006. № 1078. P. 236—247.
 10. Brouqui P., Bacellar F., Baranton G. et al. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe // Clin. Microbiol. Infect. 2004. V. 10. P. 1108—1132.
 11. Cao W.C., Zhao Q.M., Zhang P.H. et al. Prevalence of *Anaplasma phagocytophila* and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes persulcatus* ticks from northeastern China // Am. J. Trop. Med. Hyg. 2003. V. 68. P. 547—550.
 12. Ravyn M.D., Korenberg E.I., Oeding J.A. et al. Monocytic *Ehrlichia* in *Ixodes persulcatus* ticks from Perm, Russia // Lancet. 1999. № 27. P. 722—723.
 13. Rar V.A., Fomenko N.V., Dobrotvorsky A.K. et al. Tickborne pathogen detection, Western Siberia, Russia // Emerg. Inf. Dis. 2005. V. 11. P. 1708—1715.
 14. Strle F. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe // Int. J. Med. Microbiol. 2004. № 293. Suppl. 37. P. 27—35.
 15. Walder G., Lkhamsuren E., Shagdar A. et al. Serological evidence for tick-borne encephalitis, borreliosis, and human granulocytic anaplasmosis in Mongolia // Int. J. Med. Microbiol. 2006. № 296. Suppl. 1. P. 69—75.