

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2010

Л.С.Карань¹, Н.М.Колясникова^{1,5},
М.Г.Топоркова², М.А.Махнева²,
М.В.Надеждина², А.Ю.Есаулкова³,
В.В.Романенко³, Е.А.Арумова⁴,
А.Е.Платонов¹, В.В.Малеев¹

ПРИМЕНЕНИЕ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ РАЗЛИЧНЫХ КЛЕЩЕВЫХ ИНФЕКЦИЙ

¹Центральный НИИ эпидемиологии, Москва; ²Городская клиническая больница №33, ³Центр гигиены и эпидемиологии в Свердловской области, Екатеринбург; ⁴Центр гигиены и эпидемиологии в Московской области; ⁵Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П.Чумакова, Московская область

Цель. Создание и испытание комплекса ПЦР-методик для выявления патогенов, переносимых клещами, в клиническом материале и объектах окружающей среды. **Материалы и методы.** Разработаны методики ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени для детекции вируса клещевого энцефалита, *Borellia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia muris/E.chaffeensis* и *Borrelia miyamotoi*. Первые 4 методики объединены в одну тест-систему в формате мультипрайм. Эффективность комплекса методик оценена путем исследования проб крови больных иксодовым клещевым боррелиозом (166 пациентов), клещевым энцефалитом (22 пациента) и микст-инфекцией — клещевой энцефалит + боррелиоз (21 пациент) из Свердловской области. **Результаты.** Показано, что при ПЦР-исследовании проб крови, взятых при поступлении больного, возможно установление этиологии заболевания у 39% больных, в то время как на основании серологических данных диагноз, как правило, ставится не ранее второй недели лечения. Ложно-положительные результаты ПЦР-диагностики отсутствовали. Заболевания, вызванные анаплазмой или эрлихиями, методом ПЦР не выявлены. Показано, что более 50% случаев клещевого боррелиоза в безэритемной форме были вызваны *B.miyamotoi*, среди возбудителей боррелиоза в эритемной форме преобладали боррелии комплекса *B.burgdorferi sensu lato*. **Заключение.** Предложенный комплекс методик полезен для экспресс-диагностики клещевых инфекций, включая ранее неизвестную инфекцию, вызванную *B.miyamotoi*.

Журн. микробиол., 2010, № 3, С. 72—77

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита, *Borellia burgdorferi sensu lato*, *B.miyamotoi*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia muris*, *E.chaffeensis*, ПЦР в режиме реального времени

L.S.Karan¹, N.M.Kolyasnikova^{1,5},
M.G.Toporkova², M.A.Makhneva²,
M.V.Nadezhdina², A.Yu.Esaulkova³,
V.V.Romanenko³, E.A.Arumova⁴,
A.E.Platonov¹, V.V.Maleev¹

USAGE OF REAL TIME POLYMERASE CHAIN REACTION FOR DIAGNOSTICS OF DIFFERENT TICK-BORNE INFECTIONS

¹Central Research Institute of Epidemiology, Moscow; ²City Clinical Hospital No. 33; ³Center of Hygiene and Epidemiology in Sverdlovsk region, Ekaterinburg; ⁴Center of Hygiene and Epidemiology in Moscow region; ⁵Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalites, Moscow region, Russia

Aim. To create and test the complex of polymerase chain reaction-based methods for detection of pathogens vectored by ticks in clinical and environmental samples. **Materials and methods.** Real time PCR methods with hybridization-fluorescent detection were developed for detection of tick-borne encephalitis virus, *Borellia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia muris/E.chaffeensis*, and *B.miyamotoi*. First four methods were combined in one assay in multiprime format. Efficacy of the assay was assessed by testing of blood samples from patients with tick borreliosis (166 patients), tick-borne encephalitis (22 patients) and mixed infection — tick-borne encephalitis + borreliosis (21 patients) from Sverdlovsk region. **Results.** It was shown that using PCR-based assay for testing the blood samples obtained during admission, it was possible to determine the etiology of disease in 39% of patients, whereas on the basis of serological data diagnosis, as a rule, is made not earlier than on 2nd week of therapy. False-positive results of PCR diagnostics were not observed. Infections caused by *Anaplasma* or *Ehrlichia* were not observed. It was shown that >50% of cases of tick borreliosis without erythema were caused by *B.miyamotoi*, whereas *B.burgdorferi sensu lato* predominated as a causative agent of erythemic form of borreliosis. **Conclusion.** Proposed complex of methods is useful for rapid diagnostics of tick-borne infections including previously unknown infection caused by *B.miyamotoi*.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2010, No. 3, P. 72—77

Key words: tick-borne encephalitis virus, *Borellia burgdorferi sensu lato*, *B.miyamotoi*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia muris*, *E.chaffeensis*, RT-PCR

ВВЕДЕНИЕ

Развитие молекулярных методов обогатило наши знания о биологии возбудителей инфекционных заболеваний, об их эволюции и нашло свое отражение в развитии новых методов диагностики и совершенствовании эпидемиологического мониторинга. На протяжении ряда последних лет произошло расширение спектра диагностических наборов для детекции бактериальных и вирусных патогенов, передаваемых клещами рода *Ixodes*. Переносчики исследуются на присутствие вируса клещевого энцефалита (ВКЭ), боррелий, анаплазм, эрлихий, риккетсий, бартонелл, бабезий и других микроорганизмов, часть которых являются возбудителями инфекционных заболеваний. В ряде регионов сыворотки людей, заболевших после присасывания клеща, активно исследуются на наличие специфических антител как к ВКЭ и *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*B. burgdorferi* sl), так и к возбудителям гранулоцитарного анаплазмоза и моноцитарного эрлихиоза человека [1, 6]. Помимо моноинфекций выявляются случаи сочетанной инфекции, обусловленной несколькими клещевыми патогенами в различных ассоциациях [5].

В течение последних пяти лет сотрудники ЦНИИ эпидемиологии изучали иксодовых клещей, собранных в центральном регионе страны (Московская и Ярославская области), в Поволжье (Удмуртия), северо-западном регионе страны (Вологодская область), на Урале (Свердловская, Курганская и Челябинская области), в Сибири (Новосибирская, Иркутская и Кемеровская области). Во всех регионах в клещах *Ixodes persulcatus* были выявлены ВКЭ (за исключением Московской области), боррелии комплекса *B. burgdorferi* sl, *Anaplasma phagocytophilum* и *Ehrlichia muris*. От 10 до 15 процентов клещей, положительных в ПЦР на какой-либо из вышеперечисленных возбудителей, содержали одновременно два патогена [3, 4]. В клещах *I. persulcatus*, собранных в данных регионах, также выявляли *Borrelia miyamotoi* [2]. Эту боррелию, впервые обнаруженную в клещах *I. persulcatus* в Японии в 1995 г. [8], впоследствии находили в *Ixodes ricinus* во Франции, Германии и Швеции [7, 10], в *Ixodes scapularis* и *Ixodes pacificus* в Северной Америке [9, 11, 12], хотя уровень зараженности клещей был невысок, обычно не более 4%. Генетически *B. miyamotoi* принадлежит к группе боррелий — возбудителей возвратных лихорадок, но случаи заболеваний че-

ловека, вызванные этой боррелией, не были описаны, за одним исключением: нам удалось обнаружить РНК *B. miyamotoi* в крови 25 больных иксодовым клещевым боррелиозом (ИКБ) в Ижевске в 2003 г. [2].

Таким образом, поставленная в данной работе задача одновременной детекции нескольких возбудителей клещевых инфекций как в переносчиках и резервуарных хозяевах, так и в клиническом материале, является актуальной для современного здравоохранения [3, 12].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами на базе научно-производственной лаборатории по разработке и производству препаратов для диагностики инфекционных заболеваний человека и животных ЦНИИ эпидемиологии была разработана и апробирована методика одновременной детекции ВКЭ, *B. burgdorferi* sl, *A. phagocytophilum*, *E. muris* и *Ehrlichia chaffeensis* методом ПЦР в режиме реального времени (РВ-ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией. Мишенью для амплификации при детекции *B. burgdorferi* sl, *E. muris* и *E. chaffeensis* является 16S РНК, при детекции *A. phagocytophilum* — ген *msp2*, при детекции ВКЭ — ген *S*. Аналитическая чувствительность тест-системы для всех вышеперечисленных возбудителей составляет 5×10^3 копий/мл. Специфичность при анализе гетерологичных штаммов вирусов и бактерий составила 100%. Также при исследовании иксодовых клещей и клинического материала мы использовали разработанную нами тест-систему для детекции 16S РНК *B. miyamotoi* методом РВ-ПЦР. Для изоляции нуклеиновых кислот из суспензий клещей, лейкоцитарной фракции крови, спинномозговой жидкости (СМЖ), тканей мозга применяли набор «Рибо-преп» (Амплисенс, Москва), позволяющий одинаково эффективно экстрагировать из биоматериала РНК и ДНК. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием набора «Reverta-L» (Амплисенс, Москва). Для проведения РВ-ПЦР использовали амплификаторы RotorGene 6000 (Corbette Recherche, Австралия) и iQ5 (BioRad, США).

Эффективность данных тест-систем для выявления вышеописанных патогенов в переносчиках была подтверждена результатами исследования 363 иксодовых клещей, собранных в Дмитровском, Талдомском и Клинском районах Московской области в 2008 году.

Клиническая апробация тест-систем проводилась на материале, собранном в 2009 году от 273 пациентов, госпитализированных в Городскую клиническую больницу № 33 Екатеринбург с заболеваниями, развившимися после присасывания клеща или посещения природных зон в эпидемический сезон (табл.). Также были исследованы образцы тканей мозга от трех погибших от энцефалита пациентов.

Группы больных, включенных в исследование, и результаты ПЦР-диагностики

Серологическая диагностика	Всего больных	Число больных, в крови которых обнаружена РНК		
		<i>V. miyamotoi</i>	<i>V. burgdorferi</i> sl	ВКЭ
ИКБ, безэр. ф.	72	38	1	0
ИКБ, эр. ф.	94	4	15	0
КЭ	22	2	0	5
КЭ и ИКБ, безэр. ф.	12	2	0	3
КЭ и ИКБ, эр. ф.	9	0	0	2
Лихорадка неяс. эт.	37	3	0	0
Пр. диагн.	27	0	0	0
Всего	273	49	16	10

Диагноз «ИКБ, безэритемная форма» был поставлен на основании выявления специфического IgM в крови. Диагноз «ИКБ, эритемная форма» ставился на основании появления типичной эритемы у пациентов с укусом клеща в анамнезе. IgM к ВКЭ в крови были выявлены у 43 больных: моноинфекция отмечена в 22 случаях, 21 пациенту был поставлен также диагноз ИКБ в безэритемной (12 случаев) или эритемной (9 случаев) форме. У 60 пациентов с диагнозами других инфекционных или соматических заболеваний IgM к боррелиям и ВКЭ в крови не были выявлены. Серологические исследования в среднем проводились на 8 день пребывания в стационаре (интерквартильный диапазон: от 7 до 14 дня) и на 22 день после укуса клеща (интерквартильный диапазон: от 16 до 29 дня). Пробы крови для ПЦР исследования в 80% случаев забирались при поступлении больного, в 95% — не позже 2 дня лечения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При анализе 279 клещей *I. ricinus* методом ПЦР *V. burgdorferi* sl была выявлена в 103 пробах (37%), *V. miyamotoi* — в 3 пробах (1,1%), *A. phagocytophillum* — в 16 пробах (5,8%), эрлихии не были обнаружены. Зараженность исследованных 84 клещей *I. persulcatus* боррелиями комплекса *V. burgdorferi* sl составила 21%, *V. miyamotoi* — 3,6%, *E. muris* — 9,5%, ДНК *A. phagocytophillum* не была обнаружена. Вирус клещевого энцефалита не выявлен ни в одной из 363 проб.

Иксодовый клещевой боррелиоз, эритемная форма. Исследованы пробы крови от 94 больных. 16S РНК *V. burgdorferi* sl выявлена в 15 пробах крови; в 4 других случаях была обнаружена *V. miyamotoi* (табл.). Таким образом, диагностическая чувствительность комплекса ПЦР-методик для пациентов с эритемной формой ИКБ составила 20%.

68 проб были взяты при поступлении, включая все 15 проб (22%), содержащих РНК *V. burgdorferi* sl. В пробах, взятых на 1 — 9 день лечения, то есть после начала антибиотикотерапии, *V. burgdorferi* sl не была обнаружена. Положительные пробы, свидетельствующие о диссеминации боррелий, были получены только в группе 43 больных, исследованных в диапазоне от 14 до 19 дней после присасывания клеща; среди проб взятых ранее (29 проб) или позднее (18 проб) положительных находок не было.

Иксодовый клещевой боррелиоз, безэритемная форма. Исследовано 72 пробы крови. 16S РНК *V. burgdorferi* sl обнаружена в одной пробе, взятой на 2 день болезни при трехдневном инкубационном периоде. В 38 случаях (53%) в крови обнаружена *V. miyamotoi* (табл.). Диагностическая чувствительность комплекса ПЦР-методик составила 54%.

V. miyamotoi была обнаружена у 33 (58%) из 57 пациентов, исследованных в первые 5 дней заболевания, и только у 5 (33%) из 15 пациентов, исследованных позднее. *V. miyamotoi* реже (в 21% случаев) выявлялась в пробах крови, взятых в первые 10 дней после укуса клеща, чем в пробах, взятых в диапазоне от 12 до 34 дней после укуса (в 69% случаев).

Клещевой энцефалит. Моноинфекция ВКЭ протекала в лихорадочной (12 пациентов), менингеальной (4), очаговой (2), менингоэнцефалитической (3), энцефалополлиомиелитической (1) формах. Микстинфекция характеризовалась в 16 случаях лихорадочной, в двух — менингоэнцефалитической, и по одному разу — менингеальной, очаговой и энцефалополлиомиелитической формами.

Вирусная РНК была изолирована из крови больных с лихорадочной формой (5 случаев), менингеальной (3), менингоэнцефалитической и очаговой — по 1 случаю (табл.).

На первой неделе заболевания была взята 31 проба, в 9 из них была выявлена РНК ВКЭ. Диагностическая чувствительность ПЦР-теста в этом случае составляет 29%. Только 1 из 12 проб крови, взятых на более поздних сроках, содержала РНК ВКЭ.

РНК *V. miyamotoi* была найдена в крови двух из 12 больных с диагнозом «клещевой энцефалит, ИКБ, безэритемная форма» и двух из 22 больных с диагнозом «клещевой энцефалит». Во всех образцах различных отделов мозга трех пациентов, умерших от

энцефалита, была обнаружена РНК ВКЭ. Секвенирование РНК ВКЭ показало, что все ПЦР-положительные случаи клещевого энцефалита были вызваны ВКЭ сибирского генотипа.

Результаты исследований больных, не имеющих антител к боррелиям и ВКЭ. РНК ВКЭ и *V.burgdorferi* sl, классического возбудителя ИКБ, не были обнаружены ни в одной из проб крови от 60 пациентов. *V.miyamotoi* была обнаружена в крови трех из 37 серонегативных больных с диагнозом «лихорадка неясной этиологии после укуса клеща» (табл.), но не в крови больных с другими диагнозами (ГЛПС, ОРВИ, ОКИ, энцефаломиелополиневропатия, пиелонефрит, инсульт и т.д.). Предположительно, в небольшом проценте случаев инфекция *V.miyamotoi* может не сопровождаться продукцией IgM, выявляемых стандартными тестами и, таким образом, эти находки РНК *V.miyamotoi* можно рассматривать как истинно-положительные. В этом случае специфичность использованных тест-систем следует считать равной 100%.

Ни в одной из проб крови от 273 пациентов не были обнаружены РНК и ДНК патогенных видов анаплазм и эрлийи *A.phagocytophillum*, *E.muris*, *E.chaffeensis*,

Хотя микст-инфекции, вызванные клещевыми патогенами, возможны и были диагностированы серологически у некоторых больных, включенных в данное исследование, ни в одном образце крови не было найдена РНК/ДНК двух патогенов.

Клиническая картина инфекции, вызванной V.miyamotoi. Поскольку инфекция человека, вызываемая *V.miyamotoi* и приводящая к необходимости госпитализации и лечения больного, обнаружена впервые, необходимо дать краткую характеристику её клинической симптоматики.

Были проанализированы 142 истории болезни, в том числе 29 пациентов основной группы, которая была определена следующим образом: в крови присутствовала РНК *V.miyamotoi*; не выявлено РНК и ДНК иных патогенов; присутствовали IgM к боррелиям и отсутствовали IgM к ВКЭ. В основную группу входили 15 мужчин и 14 женщин в возрасте от 21 года до 77 лет, средний возраст равнялся 53 годам. 25 больных перенесли ИКБ в безэритемной форме, у 3 больных эритема возникла до госпитализации, у одного — в стационаре. Основные характеристики заболевания приведены ниже.

Инкубационный период равнялся в среднем 14 дням,

интерквартильный диапазон (ИД) от 10 до 16 дней. Начало болезни было острым, характеризовалось подъемом температуры до 39°C (ИД: 38,4 — 9,5°C), головной болью (у 79% больных), слабостью (у 72%), тошнотой (у 35%), миалгией (55%) и артралгией (29%), ознобом (28%). Больные обращались за медицинской помощью практически немедленно и были госпитализированы в среднем на 1 день болезни. Только трем больным с эритемой и одному без эритемы при поступлении был поставлен диагноз ИКБ, у остальных подозревали КЭ в лихорадочной форме в виде моноинфекции (15 больных) или микст-инфекции (9 больных). При поступлении наблюдалась, как правило, повышенная температура (у 80% больных), частота сердечных сокращений в среднем 90/мин (ИД: 80 — 95). Максимальная температура в стационаре в среднем 38,2°C (ИД: 37,5 — 39,0°C) держалась 1 — 2 дня; у двух больных наблюдалась вторая волна повышения температуры до назначения антибиотиков, у 4 — после назначения антибиотиков. В первые дни лечения сохранялись жалобы на слабость (у 90% больных), головную боль (у 48%) и головокружение (у 17%), миалгию (у 45%). В гемограмме отмечалась лейкопения ($4,5 \times 10^9/\text{л}$, ИД: 3,4 — $5,5 \times 10^9/\text{л}$) и тромбоцитопения ($197 \times 10^9/\text{л}$, ИД: 143 — $215 \times 10^9/\text{л}$), сдвиг в сторону палочкоядерных нейтрофилов (5%, ИД: 2 — 10%). Отличительной особенностью было повышение концентрации трансаминаз: АЛТ — 50 МЕ/л (ИД: 30 — 128 МЕ/л); АСТ — 73 МЕ/л (ИД: 37 — 125 МЕ/л); у 44% больных уровень АЛТ и АСТ был выше 50 МЕ/л.

Количественные показатели (более длительный инкубационный период, повышенная температура тела, повышенный пульс при поступлении, сниженное количество лейкоцитов и тромбоцитов, повышенный уровень трансаминаз) статистически достоверно отличают основную группу больных от группы больных ИКБ в эритемной форме (без выявления *V.miyamotoi* в крови) и группы больных ИКБ в безэритемной форме (без выявления *V.miyamotoi* в крови) — уровень значимости по непараметрическому критерию Манна-Уитни $p < 0,01$.

Ряд клинических проявлений (головная боль, тошнота, миалгия до поступления, сохраняющаяся миалгия в стационаре) достоверно чаще встречаются в основной группе больных по сравнению с группой больных ИКБ в эритемной форме (без выявления *V.miyamotoi* в крови) — уровень значимости по точному критерию Фишера $p < 0,01$.

ОБСУЖДЕНИЕ

Молекулярные методы выявления возбудителей инфекций в клещах используются давно и хорошо себя зарекомендовали

как методы, обладающие высокой специфичностью и чувствительностью, а также относительно небольшим временем получения результатов. Возможность исследования мертвого клеща на наличие вирусных и бактериальных патогенов при правильном его хранении и транспортировке расширяет возможности профилактики вышеописанных инфекций. Одновременная детекция четырех патогенов, передаваемых одним видом переносчика, существенно сокращает время дифференциальной диагностики и является удобным форматом исследования для врача-лаборанта. Включение в комплекс методик тест-системы для выявления *B. miyamotoi* представляет уникальную на сегодняшний день возможность для диагностики этой новой, ранее неизвестной инфекции.

К сожалению, в настоящий момент не представляется возможным охарактеризовать отрицательные результаты ПЦР-диагностики анаплазмоза и эрлихиоза на данной выборке больных как достоверные или как ложно-отрицательные из-за отсутствия серологического исследования сывороток в динамике. Работы в этом направлении будут продолжены.

Что касается использования метода ПЦР для детекции ВКЭ и *B. burgdorferi* s1 в клиническом материале, то достигнутая чувствительность (20 — 30%) позволяет использовать его только в качестве метода экспресс-диагностики клещевого энцефалита и классического боррелиоза в первые дни лечения, который обязательно должен быть дополнен серологическим исследованием парных проб сыворотки крови в динамике. Интересным является тот факт, что рРНК боррелий комплекса *B. burgdorferi* s1 обнаружена нами в основном (в 15 из 16 положительных проб) в крови больных с эритемной формой ИКБ, что указывает на возможность диссеминации *B. burgdorferi* s1 из локального очага инфекции как минимум у 20% больных этой группы, в том числе в отсутствие выраженных клинических признаков генерализации инфекции.

Новым явлением, обнаруженным в ходе данной работы, является присутствие рРНК *B. miyamotoi* в 53% проб от больных ИКБ в безэритемной форме в Свердловской области. Клинически инфекция *B. miyamotoi* характеризовалась лихорадкой и общинтоксикационным синдромом, что во многих чертах совпадало с клинической картиной клещевого энцефалита в лихорадочной форме и препятствовало своевре-

менному началу антибиотикотерапии. Открытие нового варианта иксодовых клещевых боррелиозов требует создания и внедрения серологических и ПЦР методик для дифференциальной диагностики данного заболевания и выяснения степени его распространенности в Евразии, а также детального исследования клинической картины и разработки предпочтительных способов терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воробьева Н.Н. Клиника, лечение и профилактика иксодовых клещевых боррелиозов. Пермь, Урал-Пресс, 1998.
2. Карань Л.С., Рудникова Н.А., Булгакова Т.А. и др. ПЦР-диагностика клинических случаев боррелиозов и риккетсиозов. В: Генодиагностика инфекционных заболеваний. М., Медицина для всех, 2004, с. 35-37.
3. Карань Л.С., Шопенская Т.А., Колясникова Н.М. и др. Применение молекулярных методов в изучении распространенности возбудителей клещевых инфекций в сочетанных очагах. Инфекц. бол. 2009, 7 (1): 87-88.
4. Коротков Ю.С., Кисленко Г.С., Буренкова Л.А. и др. Пространственная и временная изменчивость зараженности клещей *Ixodes ricinus* и *Ixodes persulcatus* возбудителем болезни Лайма в Московской области. Паразитология. 2008, 6: 441-451.
5. Попонникова Т.В., Пиневиц О.С., Бедарева Т.Ю. и др. Иммуноterapia в комплексном лечении клещевых инфекций у детей. Педиатрия. 2008, 3: 79-83.
6. Харитоненков И.Г., Masuzawa T., Okamoto I. и др. Оценка степени инфицированности возбудителями бактериальных инфекций иксодовых клещей, отловленных на территории одной из парковых зон Москвы. Журн. микробиол. 2009, 3: 14-17.
7. Fraenkel C.J., Garpmo U., Berglund J. Determination of novel *Borrelia* genospecies in Swedish *Ixodes ricinus* ticks. J. Clin. Microbiol. 2002, 40: 3308-3312.
8. Fukunaga M., Takahashi Y., Tsuruta Y. et al. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia miyamotoi* sp. nov., isolated from the ixodid tick *Ixodes persulcatus*, the vector for Lyme disease in Japan. Int. J. Syst. Bacteriol. 1995, 45: 804-810.
9. Mun J., Eisen R.J., Eisen L., Lane R.S. Detection of a *Borrelia miyamotoi* sensu lato relapsing-fever group spirochete from *Ixodes pacificus* in California. J. Med. Entomol. 2006, 43: 120-123.
10. Richter D., Schlee D.B., Matuschka F.R. Relapsing fever-like spirochetes infecting European vector tick of Lyme disease agent. Emerg. Infect. Dis. 2003, 9: 697-701.

11. Scoles G.A., Papero M., Beati L., Fish D. A relapsing fever group spirochete transmitted by Ixodes scapularis ticks. Vector Borne Zoonotic Dis. 2001, 1: 21-34.
12. Ullmann A.J., Gabitzsch E.S., Schulze T.L. et al. Three multiplex assays for detection of Borrelia

burgdorferi sensu lato and Borrelia miyamotoi sensu lato in field-collected Ixodes nymphs in North America. J. Med. Entomol. 2005, 42: 1057-1062.

Поступила 13.10.09
С переработки 08.12.09

Контактная информация: Карань Людмила Станиславовна,
111123, Москва, ул. Новогиревская, За, ЦНИИЭ, р.т. 8(495)305-54-24

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2010

В.Ю.Журавлев, О.В.Нарвская,
А.А.Вязовая, И.В.Мокроусов,
Т.Ф.Оттен, Б.И.Вишневыский*

V.Yu.Zhuravlev, O.V.Narvskaya,
A.A.Vyazovaya, I.V.Mokrousov,
T.F.Otten, B.I.Vishnevsky*

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ В ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ ДИССЕМНИРОВАННОГО ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ

MOLECULAR GENETIC TOOLS FOR ETIOLOGIC DIAGNOSTICS OF DISSEMINATED LUNG TUBERCULOSIS

*НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, НИИ фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург

*Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology; Research Institute of Phthisiopulmonology, Saint-Petersburg, Russia

Цель. Оптимизация этиологической диагностики диссеминированного туберкулеза легких (ДТЛ) и определения лекарственной чувствительности возбудителя на основе молекулярно-генетических методов. *Материалы и методы.* Изучены образцы респираторного материала больных ДТЛ с использованием метода ПЦР в режиме реального времени и тест-системы «ТБ-БИОЧИП» ИМБ РАН. Методы сполитотипирования и обратной гибридизации применяли для идентификации, генотипирования и экспресс-детекции лекарственной устойчивости к рифампицину микобактерий туберкулеза (МБТ) в окрашенных препаратах для бактериоскопии из мокроты. *Результаты.* У 76 (41,5%) из 183 больных с рентгенологическими признаками ДТЛ в образцах респираторного материала обнаружена ДНК микобактерий туберкулезного комплекса (специфичность 87,7%); мутации в гене *rpoB* и в генах *katG*, *inhA* и области *ahpC-ohyR*, ассоциированные с устойчивостью к рифампицину и изониазиду, выявлены у 67 и 79,5% больных ДТЛ соответственно. В 48,8% образцов мокроты из препаратов для микроскопии идентифицирована ДНК МБТ эпидемиологически значимого генотипа Beijing, ассоциированного с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) возбудителя туберкулеза в России. *Заключение.* Молекулярно-генетические методы позволяют использовать не только свежий респираторный, но и архивный материал для быстрой верификации диагноза ДТЛ при олигобацилярных формах туберкулеза, но и своевременно назначить и корректировать схему лечения пациента с учетом спектра индивидуальной чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам.

Aim. Improvement of etiologic diagnostics of disseminated lung tuberculosis (DLT) and determination of *Mycobacterium tuberculosis* (MBT) drug susceptibility on the basis of molecular genetic methods. *Materials and methods.* Samples from respiratory tract of patients with DLT were studied using real time polymerase chain reaction and the «TB-BIOCHIP» assay developed by Institute of Molecular Biology. Methods of spoligotyping and reverse hybridization were used for identification, genotyping and expression-detection of drug resistance of MBT to rifampicin in sputum samples stained for bacterioscopy. *Results.* In 76 (41.5%) of 183 patients with radiological signs of DLT, DNA of tuberculosis complex mycobacteria was detected in respiratory tract samples (specificity 87.7%); mutations in genes *rpoB*, *katG*, *inhA* as well as region *ahpC-ohyR* associated with resistance to rifampicin and isoniazide were revealed in 67% and 79.5% of patients with DLT respectively. In 48.8% of sputum samples, DNA of MBT of epidemically significant genotype Beijing associated with multi-drug resistance of MBT in Russia was identified. *Conclusion.* Molecular genetic methods allow to use both fresh and archived respiratory tract specimens for rapid verification of DLT diagnosis during oligobacillar forms of tuberculosis as well as timely prescribe and correct the treatment regimen of the patient according to individual drug susceptibility spectrum of the agent.