

perimental study of one of the main problems of oncology — metastasis of tumors. The study was conducted on mice C57Bl/6. For modeling of tumor growth the living tumor cells of Lewis lung carcinoma (CLL) or B16 melanoma cells were transplanted in the shin muscles of mice. Efficiency of antimetastatic action was assessed by the frequency and intensity of metastasis and growth rate of metastases. We show that glycopeptidic vaccine and polysaccharide from mushroom *L. edodes* not only inhibit the incidence of metastasis process, but also reduce the cases of metastases and inhibit their growth and spread. Antimetastatic activity of cancer vaccine and mushroom polysaccharide differs depending on the application conditions of both means combining, and features of models of tumor growth.

Key words: tumor vaccine, polysaccharide faction, antimetastatic action, metastases.

УДК 616.993.19-07

Г.В. Білецька, І.І. Бенъ

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ГРАНУЛОЦИТАРНОГО АНАПЛАЗМОЗУ ЛЮДИНИ

Державна установа "Львівський НДІ
епідеміології та гігієни МОЗ України",
лабораторія трансмісивних вірусних інфекцій

Гранулоцитарний анаплазмоз людини (ГАЛ) — трансмісивне природно-вогнищеве захворювання, що викликається анаплазмами *A. phagocytophilum* і передається через укуси іксодових кліщів (*Acari, Ixodidae*) [13, 26]. Збудник ГАЛ виявлений практично у всіх регіонах, де розповсюджені іксодові кліщі, — у більшості країн Європи, у Росії, Кореї, Китаї, Японії та США [5, 22–24, 30]. Клінічні прояви ГАЛ мають широкий спектр: від безсимптомного або субклінічного до важких форм з розвитком поліорганної недостатності, а в окремих випадках (3–6%) — до летальних наслідків [14, 18, 22, 27].

Клінічна діагностика ГАЛ утруднена внаслідок відсутності патогномонічних симптомів. Наявність вираженого інфекційного синдрому у гострому періоді хвороби і поліморфізм клінічних проявів при ГАЛ є характерними й для багатьох інших інфекцій. Крім того, первинні симптоми різних кліщових інфекцій (кліщового вірусного енцефаліту — КВЕ, Лайм-бореліозу — ЛБ) можуть перекривати один одного та маскувати наявність змішаної інфекції [4, 7, 16].

У зв'язку з цим діагностику ГАЛ лише на основі клінічних проявів, особливо первинних, слід вважати недостатньою. Тому у центрі уваги дослідників залишаються можливості лабораторної верифікації.

Мета — провести аналіз та надати порівняльну характеристику сучасних методів лабораторної діагностики ГАЛ.

Основними показами для проведення лабораторного обстеження на ГАЛ є факт присмоктання (укусу) кліща; симптоми гострого гарячкового захворювання після укусу кліща; гострий безжовтяничний гепатит та/або ураження нирок після відвідування ендемічних за ГАЛ (ЛБ) територій; захворювання на ЛБ, КВЕ та/або моноцитарний ерліхіоз (внаслідок частого поєднання цих інфекцій з ГАЛ) [31, 32]. Сучасна лабораторна діагностика ГАЛ базується на прямих (методи мікроскопії, культуральний та ПЛР) та серологічних (імуносерологічних — ІФА, НРІФ, імуноблотингу) методах [12]. Робоча група з вивчення *Rickettsia, Coxiella, Anaplasma (Ehrlichia)* і *Bartonella* (EVWOG) Європейського товариства з клінічної мікробіології та інфекційних хвороб для лабораторної діагностики ГАЛ рекомендувала ІФА (ELISA) та НРІФ для виявлення специфічних антитіл, а також ПЛР для індикації ДНК збудника [21].

У гострому періоді захворювання індикацію *A. phagocytophilum* проводять методами мікроскопії, культуральним та ПЛР (табл. 1).

Метод мікроскопії (blood smear) полягає у виявленні інтрацитоплазматичних морул (мікроколоній *Anaplasma*) у нейтрофілах при світловій мікроскопії тонкого мазка крові, клітин кісткового мозку та цереброспінальної рідини, фарбованих за Романовським–Гімзою [19, 27].

Формування видимої морули відбувається на 3–7-й дні після інокуляції анаплазм у 0,1% (0,3–6,0%) лейкоцитарних клітин, тому надійність їх виявлення залежить від досвіду і навиків дослідника [8]. Оптимальним є перегляд 500 тропних клітин крові [11]. Відомості щодо чутливості методу значно різняться (від 3% до 75%) у різних авторів [26, 27]. Низька ефективність методу може бути зумовлена або недостатнім рівнем анаплазмії у імунокомпетентних пацієнтів, у яких важкі захворювання зазвичай пов'язані з дуже низьким бактеріальним навантаженням у крові, або обстеженням пацієнта у пізній (через 2 і більше тижні від початку захворювання) стадії хвороби. Не дивлячись на недоліки, метод

Застосування різних методів діагностики гранулоцитарного анаплазмозу людини відповідно до терміну захворювання (інфікування) [32]

Термін	Оптимальний метод	Альтернативний метод
<7 днів		
ранній — від 24 до 72 год з моменту контакту з кліщем	ПЛР — виявлення ДНК анаплазм (в крові хворого)	культуральний метод (HL-60)
пізній — від 72 год і пізніше з моменту контакту з кліщем	ПЛР, світлова мікроскопія — виявлення морул у нейтрофілах (3–7-й дні після укусу кліща)	культуральний метод (HL-60)
7–14 днів	серологічні методи — ІФА/НРІФ: антитіла (IgM — 2–4-й тижні) до анаплазм	ПЛР, світлова мікроскопія
>14 днів	серологічні методи — ІФА/НРІФ: антитіла (IgG — 2-6-й тижні) до анаплазм	

мікроскопії і сьогодні не втрачає актуальності завдяки своїй доступності, простоті і можливості застосування на ранній стадії захворювання, що дуже важливо для своєчасного призначення адекватної терапії [15, 27].

Для первинного виділення і вирощування бактерій *Anaplasma (Ehrlichia) spp.* сьогодні використовується більше 30 клітинних ліній кліщів та ссавців, у тому числі і людини. Проведені дослідження показали, що для культивування анаплазм найоптимальнішою є лінія суспензійних клітин промієлоцитарної лейкемії HL-60 [17, 26]. Ріст цих клітин підтримується на середовищі RPMI-1640, що не містить антибіотиків, з додаванням 10% ембріональної (телячої) сироватки, в інкубаторі з 5% концентрацією CO₂ при 37°C. Для виділення анаплазм забір крові проводять у гострій фазі захворювання, коли концентрація циркулюючих інфікованих нейтрофілів максимальна. Чутливість методу складає 55,0% на першому, 33,0% — на другому тижні захворювання. Ступінь інфікування оцінюють за кількістю клітин культури з морулами за допомогою фарбування методом Романовського–Гімзи. Формування видимої морули виявляється у культивованих клітинах на 5-й день після внесення крові хворих, лізис клітин відбувається у середньому впродовж 12–14 днів [17, 25]. Застосування методу дозволене лише у лабораторіях 3-го ступеня безпеки і обмежене внаслідок високої трудоемкості процесу, вибагливості і високої вартості культури клітин, поживних середовищ, ембріональної сироватки та довготривалості (до декількох тижнів) дослідження [18].

Метод ПЛР (polymerase chain reaction) — індикація специфічних локусів геному збудника —

надає найбільш оперативну і точну діагностичну інформацію, що особливо важливо у випадках сумнівних результатів серологічного дослідження [20]. ПЛР широко використовується для детекції геномного матеріалу патогенів *in vitro* і в об'єктах довкілля. За чутливістю і специфічністю метод ПЛР не поступається культуральному, до того ж його постановка триває значно менше [2, 7]. Для діагностики ГАЛ використовуються кілька модифікацій ПЛР (з детекцією в агарозному гелі, з детекцією за кінцевою точкою, у реальному часі) з наступними праймерами: рPHK 16S rRNA, groESL, epank1 and P44 (msp2) [27, 29]. Методи на основі ПЛР ще не стандартизовані і можуть надавати суперечливі результати. Діагностична чутливість ПЛР-аналізу при виявленні збудника ГАЛ варіює від 67 до 90% [27]. Важливо, що позитивні результати ПЛР у гострому періоді ГАЛ спостерігаються приблизно з однаковою частотою у різні терміни від початку захворювання, тому лабораторна верифікація із застосуванням цього методу доцільна впродовж всього гострого періоду захворювання [29]. Разом з тим, дослідження останніх років показали, що достовірність результатів ПЛР значно варіює у залежності від виду біологічних зразків від хворих, тому зараз її не рекомендовано використовувати як самостійний скринінговий тест [7]. Метод не завжди є доступним через необхідність застосування високовартісного обладнання, тест-систем та кваліфікованого персоналу для постановки реакції.

Найпоширеніший спосіб лабораторного підтвердження ГАЛ — серологічна верифікація, яка дозволяє якісно і напівкількісно інтерпретувати результати, призначені для епідеміологічних

і клінічних досліджень та моніторингу терапії захворювання [3, 7]. Основна мета серологічних досліджень — оцінка зростання титрів специфічних антитіл (IgM, IgG) у парних сироватках, яке засвідчує “свіже” зараження патогеном. У деяких пацієнтів “ранні” антитіла вдається виявити через 7 днів після перших клінічних проявів хвороби. Однак, зазвичай, у перший тиждень захворювання серологічне обстеження на ГАЛ дає переважно негативні результати (внаслідок особливостей гуморальної відповіді у хворих), що не виключає можливість їх інфікування анаплазмами. Максимум IgM антитіл спостерігається на 12–17-й дні від початку хвороби, після чого їх концентрація поступово зменшується [8]. Для верифікації діагнозу (свіжого інфікування) ГАЛ у серопозитивних пацієнтів практикують виявлення IgM антитіл в парних сироватках крові, взятих на 2-му і 4-му тижнях хвороби. У більш пізні терміни, як і у перші дні захворювання, імуноглобуліни М можуть не виявлятися. Максимальний титр антитіл IgG реєструється в сироватці крові пацієнтів на 27–39-й дні хвороби, після чого із незначним зниженням титру антитіла зберігаються в організмі інфікованої людини довгий час (не менше 2 років). Lotric-Furlan із співавт. та Е. Коренберг при повторних дослідженнях сироваток крові перехворілих на ГАЛ IgG антитіла до *A. phagocytophilum* у діагностичних титрах виявляли у 66,7% пацієнтів через рік та у 55,6% через два роки після хвороби [31]. Антитіла IgG забезпечують вторинну імунну відповідь: у випадку повторного інфікування анаплазмами перехворілого на ГАЛ, антитіла IgG у нього з’являються раніше і у вищому титрі. Антитіла IgG вважаються більш специфічними ніж IgM, через що їх 4-кратне збільшення розглядають як достовірний доказ наявності ГАЛ [31, 32].

Метод РНІФ (indirect fluorescent antibody (IFA) staining method) застосовується як для діагностики ГАЛ на різних етапах хвороби, так і при вивченні імуноструктури населення для визначення територій поширення інфекції. Діагностична чутливість РНІФ для визначення специфічних IgG антитіл складає 82–100%, специфічність оцінюється у 83% [13]. В даний час РНІФ використовують рідше ніж ІФА внаслідок відсутності стандартизації методу та можливості перехресних реакції [9]. Однак, на відміну від ІФА, цей метод дає можливість визначати “додіагностичні” титри у перших, відібраних на ранніх стадіях інфікування, сироватках, тобто

виявляти потенційних хворих на ГАЛ (і призначити їм повторне обстеження). Тому РНІФ все ще залишається на озброєнні багатьох дослідників [27]. В Україні, у зв’язку з відсутністю сертифікованих тест-систем, для виявлення специфічних антитіл сьогодні РНІФ для діагностики ГАЛ не застосовується.* (* Спроби розробки вітчизняних тест-систем для РНІФ здійснено спільними зусиллями ДУ “Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України” та Харківського Національного медичного університету МОЗ України [9].)

ІФА — найбільш прийнятний метод оперативного вирішення питання про наявність специфічних антитіл [3], який вигідно відрізняє економічність та відносна простота. Значно підвищити специфічність (до 98%) і чутливість (87%) методу дозволило застосування рекомбінантного антигену, виготовленого з використанням поверхневого білка 44-kDa (HGA-44) [6]. Недоліками методу є часті псевдонегативні результати на ранньому етапі захворювання (до 2–3 тижнів після присмокування кліща), а також значна негативна сероконверсія [8]. Найбільш демонстративний період для виявлення IgG антитіл методом ІФА — з 3-го по 6-й тиждень (з максимальними показниками на 4–5-му тижнях) від початку захворювання, IgM — на 2–4-му тижнях [8]. При застосуванні ІФА не виключені й хибнопозитивні результати, обумовлені технічними причинами.

Через це позитивний результат лише в ІФА деякі дослідники вважають недостатнім для остаточного заключення про серопозитивність пацієнта [5].

На думку багатьох дослідників **імуноблотинг** (ІБ) (immunoblotting) — фактично кінцевий верифікаційний метод у ланцюгу серологічних досліджень, який дозволяє зробити остаточне заключення про серопозитивність/серонегативність пацієнта [27, 28, 31]. Інші вважають його застосування при ГАЛ недоцільним і рекомендують обмежитись результатами ІФА [7]. Принциповим є те, що застосування імуноблоту далеко не повністю вирішує проблеми серодіагностики ГАЛ (та інших “кліщових” інфекцій). Серед основних причин: оцінка результатів проводиться часто візуально, тому є суб’єктивною і залежить від кваліфікації персоналу; критерії оцінки результатів імуноблоту складні, вони відрізняються в окремих країнах, де циркулюють різні штами збудника, які використовують фірми-виробники

для виготовлення діагностичних наборів; застосування імуноблоту (ІБ) значно підвищує вартість серологічного аналізу. Взагалі, застосування ІБ обмежене внаслідок значних економічних витрат, працездатності постановки і перехресних результатів з моноцитарним ерліхіозом людини [14, 19].

В Україні попередніми дослідженнями докази активної циркуляції збудника ГАЛ отримані для території 8 областей західного, центрального та східного регіонів [10]. Встановлено, що *A. phagocytophilum* є етіологічним фактором 14,3–16,1% випадків недиагностованих сезонних гарячкових захворювань, у західному регіоні рівень інфікованих анаплазмами переносників сягає 9,18% і кожний десятий житель (10,2%) контактує із збудником ГАЛ [1]. Однак при відсутності лабораторної діагностики реальна поширеність і захворюваність на ГАЛ у країні невідома. Недостатня забезпеченість відповідним обладнанням та відсутність на вітчизняному ринку сертифікованих тест-систем для ПЛР, ІФА, НРІФ спрямовує на запровадження більш доступного для практичних закладів МОЗ України методу діагностики.

Враховуючи дану ситуацію, з метою апробації методу мікроскопії для ранньої діагностики ГАЛ, нами було проведено порівняльний аналіз результативності (чутливості і специфічності) цього методу та ІФА.

Одночасно 32 хворих обстежено методами мікроскопії та ІФА (“Омнікс”, Санкт-Петербург, Росія). Час від початку захворювання (присмоктування кліща) до проведення досліджень коливався від 2 до 21 дня (у середньому 9,2 дня). Кількість позитивних проб при використанні методу мікроскопії була у 1,6 разів більшою ніж в ІФА: морули виявлені у 14 (43,8%), специфічні антитіла — у 9 (28,1%), співпадіння результатів двох методів отримано для 7 (21,9%) хворих. Позитивні результати мікроскопії були підтверджені в ІФА для 50% (7 із 14) випадків. Негативні

результати дослідження методом мікроскопії отримані для 18 (56,3%), в ІФА — для 23 (71,9%) хворих, результати обох методів співпали у 14 (43,7%) випадках. За проведеними розрахунками чутливість методу мікроскопії у порівнянні з показниками для ІФА дорівнювала 77,8%, специфічність — 60,9% (табл. 2).

Між результатами методів прямої мікроскопії та ІФА виявлено прямий сильний зв'язок: коефіцієнт кореляції ($r=0,8$ ($p<0,5$)). Тобто, за рівнем чутливості і специфічності метод мікроскопії виявився близьким до ІФА, який у цьому відношенні не має принципових переваг. Для підтвердження легітимності отриманих даних позитивні зразки були досліджені в ПЛР (“Амплі-ГАЛ-ПЛР” ООО “НПФ “ЕПІТОП”, Санкт-Петербург, Росія). Специфічна ДНК виявлена майже в однаковій кількості проб при використанні мікроскопії (50,0%) та ІФА (44,4%).

Висновки. Аналіз сучасного стану лабораторної діагностики ГАЛ у світі свідчить, що застосування лише одного методу є недостатнім і не забезпечує достовірної інформації про захворювання на ГАЛ. Для більшості відомих і “нових” природно-вогнищевих зоонозів однією з найважливіших залишається проблема гіподіагностики, внаслідок чого реальна захворюваність значно (в 10 і більше разів) перевищує ту, що реєструється. Головна причина — низький рівень забезпеченості лабораторної служби сертифікованими діагностичними препаратами нового покоління. Враховуючи неоднозначність результатів серологічної діагностики (незалежно від використаного тесту) та особливостей прямих методів (культуральний і ПЛР), оптимальним є застосування декількох методів лабораторної діагностики. Доцільність застосування конкретного методу визначається дотриманням оптимального терміну захворювання та використанням відповідного матеріалу. Це дозволить економно використовувати діагностичні препарати і більш чітко інтерпретувати результати.

Таблиця 2

Розрахунки результатів порівняльного вивчення ефективності методу мікроскопії щодо імуноферментного аналізу для лабораторної діагностики гранулоцитарного анаплазмозу людини

Характеристика методу	Визначення	Показник (%)
Чутливість	Кількість позитивних результатів мікроскопії, які підтвердились в ІФА / кількість позитивних результатів ІФА=7/9	77,8%
Специфічність	Кількість від'ємних результатів мікроскопії, які підтвердились в ІФА / кількість від'ємних результатів ІФА=14/23	60,9%

В Україні, де, за результатами попередніх досліджень, є всі передумови передбачати, що за поширеністю і значенням в інфекційній патології захворюваність на кліщові зоонози посяде друге місце (після ЛБ) у структурі, впровадження лабораторної діагностики є особливо актуальним. В умовах обмеженого фінансування лікувальних установ та закладів державної санітарно-епідеміологічної служби України і повної відсутності сертифікованих тест-систем виявлення морулоутворення при мікроскопії мазків периферичної крові можна розглядати як попередній (ймовірний) критерій етіологічної діагностики ГАЛ на ранній стадії захворювання. Впровадження цього економічного і доступного методу сприятиме здійсненню повсюдної експрес-діагностики ГАЛ у первинній медичній мережі.

Перспективи подальших досліджень. Мікроскопія мазків периферичної крові, забарвлених за Романовським–Гімзою може бути методом вибору на першому етапі вивчення поширеності і захворюваності населення на ГАЛ. По-друге, цей метод може застосовуватись і для диференційної діагностики кліщових інфекцій на ендемічних територіях, в першу чергу, в умовах поєднаних природних вогнищ. Для остаточного підтвердження або спростування цих заключень планується здійснення подальших комплексних досліджень.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бень І.І. Основні результати вивчення гранулоцитарного анаплазмозу людини у двох областях західного регіону України / І.І. Бень, Г.В. Білецька // Сучасні проблеми епідеміології, мікробіології, гігієни та туберкульозу: матер. наук.-практ. конфер., Львів, травень 2013 р. / ДУ "Львівський НДІ епідеміології та гігієни МОЗ України" [та ін.]. — Вип. 10. — Львів: ДУ "ЛНДІЕГ МОЗ України", 2013. — С. 94–97.
2. Бондаренко Е.И. Выявление возбудителей инфекций, переносимых клещами, с помощью наборов серии "Реал-Бест" с использованием ПЦР-анализа в режиме реального времени / Молекулярно-генетические методы исследования в медицине и биологии / Е.И. Бондаренко, Д.И. Тимофеев, М.К. Иванов // Матер. междунар. науч.-практ. конфер. 23–24 февраля 2012 г. — Караганда, 2012. — С. 49–56.
3. Выявление антител к возбудителям гранулоцитарного анаплазмоза и моноцитарного эрлихиоза человека в крови пациентов из Новосибирской области / В.А. Рар, Н.В. Фоменко, О.В. Мельникова, Н.Я. Черноусова // Бюл. сибирской медицины. Приложение 1. Актуальные вопросы неврологии. — Новосибирск, 2008. — С. 73–77.
4. Гранулоцитарный анаплазмоз человека и микст-инфекция с иксодовым клещевым боррелиозом / В.Ю. Тетерин, Э.И. Коренберг, В.В. Нефедова, Н.Н. Воробьева, В.И. Фризен, М.В. Якушева // Инфекционные болезни. — 2012. — Т. 10, № 1. — С. 21–27.
5. Гранулоцитарный анаплазмоз человека: особенности клинических проявлений в России / М.В. Афанасьева, Н.Н. Воробьева, Э.И. Коренберг, В.И. Фризен, Т.Е. Манокина // Инфекционные болезни. — 2006. — Т. 4, № 2. — С. 24–28.
6. Иммуноферментный анализ и полимеразная цепная реакция в лабораторной диагностике гранулоцитарного анаплазмоза человека / В.Ю. Тетерин, Э.И. Коренберг, В.В. Нефедова, Н.Н. Воробьева, В.И. Фризен // Журн. инфектологии. — 2012. — Т. 4, № 2. — С. 33–39.
7. Нафеев А.А. Лабораторные исследования в диагностике природно-очаговых инфекций / А.А. Нафеев, Н.В. Савельева, Э.И. Сибеева // Клин. лаб. диагностика. — 2011. — № 5. — С. 52–53.
8. Оловянных С.П. Гранулоцитарный анаплазмоз человека / С.П. Оловянных, Е.В. Селиванов // Вестник лаборатории ДНК-диагностики. — 2012. — № 2. — С. 30–33.
9. Перехресні реакції при імунодіагностиці анаплазмозної інфекції методом НРІФ / С.І. Похил, О.М. Тимченко, Ю.В. Лісяк, Н.А. Чигиринська [та ін.] // Annals of Mechnikov Institute. — № 3. — 2010. — www.imiamn.org.ua/journal.htm. — С. 38–44.
10. Перші результати вивчення анаплазмозів в Україні / Г.В. Білецька, В.І. Федорук, О.Б. Семенишин, І.І. Бень // Матер. конфер. до Дня Науки "Сучасні проблеми епідеміології, мікробіології та гігієни". — Вип. 5. — Львів. — 2007. — С. 418–420.
11. Семеренская Е.И. Оптимизация микроскопического исследования образцов клинического материала для выявления морулообразования, индуцированного анаплазмами / Е.И. Семеренская // Национ. приоритеты России. — 2009. — № 2. — С. 111–112.
12. Современные представления о диагностике клещевых инфекций / А.Н. Усков, К.Д. Байгеленов, О.А. Бургазова, Н.Е. Гринченко // Сибирский медиц. журнал. — 2008. — № 7. — С. 148–152.
13. Clair K.St. Ehrlichioses: anaplasmosis and human ehrlichiosis / K.St. Clair, C.F. Decker // Dis. Mon. — 2012. — № 58 (6). — P. 346–354.
14. Clinical findings and diagnosis in human granulocytic anaplasmosis: a case series from Massachusetts / A.A. Weil, E.L. Baron, C.M. Brown, M.S. Drapkin // Mayo Clin. Proc. — 2012. — № 87 (3). — P. 233–239.
15. Comparison of a real-time PCR method with serology and blood smear analysis for diagnosis of human anaplasmosis: importance of infection time course for optimal test utilization / A.M. Schotthoefer, J.K. Meece, L.C. Ivacic, P.D. Bertz [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2013. — Vol. 51, № 7. — P. 2147–2153.
16. Differences and similarities between culture-confirmed human granulocytic anaplasmosis and early lyme disease / G.P. Wormser, M.E. Aguero-Rosenfeld, M.E. Cox, J. Nowakowski [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2013. — Vol. 51, № 3. — P. 954–958.
17. Direct cultivation of the causative agent of human granulocytic ehrlichiosis / J.L. Goodman, C. Nelson, B. Vitale, J.E. Madigan [et al.] // N. Engl. J. Med. — 1996. — № 4. — P. 209–215.
18. Dumler J.S. Ehrlichiosis in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment / J.S. Dumler, J.E. Madigan, N. Pusterla, J.S. Bakken // Clin. Infect. Dis. — 2007. — Vol. 1 (Suppl. 1). — P. 45–51.
19. Gangulya S. Tick-borne ehrlichiosis infection in human beings / S. Gangulya, S.K. Mukhopadhyay / Blood smear analysis in babesiosis, ehrlichiosis, relapsing fever, malaria, and Chagas disease // J. Vector Borne Dis. — 2008. — № 45. — P. 273–280.

20. Ghafar W.M. Molecular survey of five tick-borne pathogens (*Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Babesia microti*) in Egyptian farmers / W.M. Ghafar, N.A. Eltablawy // *Global. Veterinaria*. — 2011. — № 7 (3). — С. 249–255.
21. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe / P. Brouqui, F. Bacellar, G. Baranton [et al.] // *Clin. Microbiol. Infect.* — 2004. — № 10. — P. 1108–1132.
22. Human anaplasmosis presenting as atypical pneumonitis in France / V. Remy, Y. Hansmann, De Martino, D. Christmann, P. Brouqui // *Clin. Inf. Dis.* — 2003. — Vol. 37, № 6. — P. 846–848.
23. Human granulocytic Anaplasmosis, Japan / N. Ohashi, G. Wuritu, F. Kawamori, D. Wu [et al.] // *Emerg. Infect. Dis.* — 2013. — № 19 (2). — P. 289–292.
24. Increasing Incidence of *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* in the United States, 2000–2007 / F.S. Dahlgren, E.J. Mandel, J.W. Krebs [et al.] // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* — 2011. — № 85 (1). — P. 124–131.
25. Karki P. *Anaplasma phagocytophilum* infection induces apoptosis in HL-60 cells / P. Karki, J.W. IJdo // *World J. Microbiol. Biotechnol.* — 2011. — № 27 (11). — P. 2741–2746.
26. Nahed I. Human Ehrlichiosis and Anaplasmosis / I. Nahed, K.C. Bloch, J.W. McBride // *Clin. Lab. Med.* — 2010. — Vol. 30, № 1. — P. 261–292.
27. Nordberg M. Tick-Borne Infections in Humans. Aspects of immunopathogenesis, diagnosis and co-infections with *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* / Linköping University Medical Dissertations, No. 1315. — Linköping, Sweden, 2012. — 139 p.
28. Prevalence of seropositivity to spotted fever group rickettsiae and *Anaplasma phagocytophilum* in a large, demographically diverse US sample / P.C. Graf, J.P. Chretien, L. Ung [et al.] // *Clin. Infect. Dis.* — 2008. — № 46 (1). — P. 70–77.
29. Rymaszewska A. PCR for detection of tick-borne *Anaplasma phagocytophilum* pathogens: a review / A. Rymaszewska // *Veterinarni Medicina*. — 2011. — № 56 (11). — P. 529–536.
30. Seroprevalence of Human Granulocytotropic Anaplasmosis in Central and Southeastern China / S. Zhang, R. Hai, W. Li [et al.] // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* — № 81 (2). — 2009. — P. 293–295.
31. Serological survey in persons occupationally exposed to tick-borne pathogens in cases of co-infections with *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Bartonella* spp. and *Babesia microti* / J. Chmielewska-Badora, A. Moniuszko, W. Żukiewicz-Sobczak, J. Zwoliński [et al.] // *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. — 2012. — Vol. 19, № 2. — P. 271–274.
32. Thomas R.J. Current management of human granulocytic anaplasmosis, human monocytic ehrlichiosis and *Ehrlichia ewingii* ehrlichiosis / R.J. Thomas, J.S. Dumler, J.A. Carlyon // *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* — 2009. — № 7 (6). — P. 709–722.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ГРАНУЛОЦИТАРНОГО АНАПЛАЗМОЗА ЧЕЛОВЕКА

Г.В. Белецкая, И.И. Бень

ГУ «Львовский НИИ эпидемиологии и гигиены МЗ Украины»
Лаборатория трансмиссивных вирусных инфекций

В последние годы спектр природно-очаговых инфекций бактериальной природы в Украине расширился за счет выявления ранее неизвестных этиологических аген-

тов и среди них — гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ). Сегодня это третья (после Лайм-боррелиоза и клещевого вирусного энцефалита) по распространению клещевая инфекция в Европе. Гранулоцитарный анаплазмоз человека — трансмиссивное природно-очаговое заболевание, которое вызывается анаплазмами *A. phagocytophilum* и передается через укус иксодовых клещей (*Acari, Ixodidae*). Спектр клинических проявлений ГАЧ варьирует от бессимптомных до тяжелых форм с развитием полиорганной недостаточности (дыхательной, почечной, печеночной) и поражений нервной системы. Летальность, даже при ранней диагностике и своевременном лечении, составляет 3–5%, в США 7–10%. Все это обуславливает актуальность своевременной и эффективной диагностики ГАЧ, особенно в таких странах, как наша, где его изучение находится в “зачаточном” состоянии. В связи со значительным полиморфизмом клинических проявлений, отсутствием патогномичных симптомов, а у части пациентов — клинических проявлений вообще (инаппарантные формы), диагностика ГАЧ невозможна без применения лабораторных методов исследования. Результаты лабораторных тестов имеют подтверждающее значение для постановки окончательного диагноза. На современном этапе лабораторная диагностика включает прямые и серологические (иммуносерологические) методы. Для серодиагностики применяют непрямую реакцию иммунофлюоресценции (НРИФ), иммуноферментный анализ (ИФА) и/или иммуноблоттинг (ИБ). Вследствие замедленного иммуногенеза и недостаточно высокой чувствительности тест-систем применение этих методов нецелесообразно в первую неделю острого периода заболевания. Серологическое обследование больных в это время дает преимущественно негативные результаты, что, однако, не исключает возможности инфицирования анаплазмами. Кроме того, применение серологических методов не оправдано при серонегативных вариантах ГАЧ и при отсутствии четкого нарастания антител или сероконверсии и антител. Для верификации диагноза ГАЧ у серопозитивных пациентов исследуют парные сыворотки крови, взятые на 2-й и 4-й неделях заболевания. То есть, серологические методы мало эффективны в случаях необходимости экспресс-диагностики заболевания.

Прямые методы отличаются высокой чувствительностью и специфичностью, но также не лишены ряда недостатков. Для выделения возбудителя необходимо осуществить забор крови в острой фазе заболевания, когда концентрация нейтрофилов достигает максимального уровня. Культуральный метод диагностики ГАЧ сложный, требует использования специальных дефицитных клеточных культур, дорогостоящих питательных сред, а его постановка занимает от двух до трех недель.

Наиболее оперативную и точную диагностическую информацию позволяет получить полимеразная цепная реакция (ПЦР) с праймерами на участок ДНК 16S субъединицы рРНК. При ГАЧ постановка ПЦР рекомендована в течение всего острого периода заболевания. Однако, ПЦР не стандартизирована. Ее чувствительность и специфичность меняются в зависимости от исследуемого материала. Для определения условий эффективного применения необходима практическая апробация ПЦР на репрезентативном клиническом материале.

Метод микроскопии — выявление морул в периферических мазках крови пациента. Диагностическая чувствительность микроскопического метода по данным разных авторов варьирует в значительных пределах: от 2% до 75%. Низкая эффективность метода может быть обусловлена либо недостаточным уровнем анаплазмоза у иммунокомпетентных пациентов или недостаточным уровнем квалификации исследователей.

Таким образом, каждому из лабораторных методов диагностики присущи как положительные так и отрицательные свойства. Оптимальным является применение нескольких методов (в частности, ПЦР и ИФА) лабораторной диагностики. При этом целесообразность применения конкретного метода определяется использованием соответствующего материала и соблюдением оптимального срока его отбора (соответствующей стадии заболевания).

На первых этапах изучения в условиях недостаточной обеспеченности соответствующим оборудованием и отсутствием на отечественном рынке сертифицированных тест-систем для ПЦР, ИФА, НРИФ более доступным методом диагностики ГЧ для практических учреждений Минздрава Украины можно рассматривать метод микроскопии. Большим преимуществом метода является возможность своевременной (ранней) постановки диагноза. Морулы наиболее надежно визуализируются в острой фазе инфекции и даже в первую неделю заболевания. Результаты многих исследователей показывают, что, когда квалифицированный специалист выявляет характерные включения телец в мазке периферической крови, диагноз HGA может быть поставлен быстрее, чем при применении ПЦР.

С целью определения возможности дальнейшего применения в клинической практике Украины метода микроскопии проведено исследование его оценки по сравнению с наиболее распространенным тестом — ИФА.

Одновременно 32 больных обследованы методами микроскопии и ИФА (“Омникс”, Санкт-Петербург, Россия). Количество положительных проб при использовании метода микроскопии было в 1,6 раз больше чем в ИФА: морулы обнаружены у 14 (43,8%), специфические антитела — у 9 (28,1%). Положительные результаты микроскопии были подтверждены в ИФА для 50% (7 из 14) случаев. По проведенным расчетам чувствительность метода микроскопии по сравнению с показателями для ИФА равнялась 77,8%, специфичность — 60,9%. Показано, что по уровню чувствительности и специфичности метод микроскопии близок к ИФА, который в этом отношении не имеет принципиальных преимуществ.

Таким образом, применение только одного метода является недостаточным и не обеспечивает достоверной информации о заболевании ГЧ. Целесообразность применения конкретного метода определяется соблюдением оптимального срока заболевания и использования соответствующего материала. Это позволит экономно использовать диагностические препараты и более четко интерпретировать результаты. Микроскопия мазков периферической крови, окрашенных по Романовскому—Гимзе, может быть методом выбора на первом этапе изучения распространенности и заболеваемости населения ГЧ в Украине. Этот метод может применяться также и для дифференциальной диагностики клещевых инфекций на эндемических территориях, в первую очередь, в условиях объединенных природных очагов.

Ключевые слова: гранулоцитарный анаплазмоз человека, лабораторная диагностика, микроскопия, иммуноферментный анализ, полимеразная цепная реакция, Украина.

LABORATORY DIAGNOSIS OF HUMAN GRANULOCYTTIC ANAPLASMOSIS

H.V. Biletska, I.I. Ben

State Institution “Lviv Research Institute of Epidemiology and Hygiene, Ministry of Health of Ukraine”

In recent years, a spectrum of natural focal bacterial infections in Ukraine increased by identifying of previously unknown etiologic agents and among them — human granulocytic anaplasmosis (HGA). Today HGA is the third tick-borne infections (after Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis) in Europe by distribution. Human granulocytic anaplasmosis (HGA) — transmissible natural focal disease, which is caused by *Anaplasma phagocytophilum* and transmitted through the bite of ticks (*Acari, Ixodidae*). The spectrum of clinical manifestations varies from asymptomatic to severe forms. The development of multiple organ failure (respiratory, kidney, liver), is possible as well as lesions of the nervous system. Lethality is 3–5% in the US 7–10% even in the early diagnosis and timely treatment. It determines the actuality of timely and effective diagnosis. HGA study is in incipient stage especially in countries such as ours. The disease is characterized by considerable polymorphism of clinical manifestations, absence of pathognomonic symptoms, and in some patients — inapparent form of the disease. So diagnosis is not possible without the laboratory tests. Laboratory tests results are confirming the value for the final diagnosis. Now laboratory diagnosis includes direct and serological (immunoserological) methods. For serodiagnosis, indirect immunofluorescence assay (IFA), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) or immunoblotting (IB) are used. The application of these methods is impractical in the first week of the HGA acute period. This is due to slow immunogenesis and not high enough (insufficient high) sensitivity of test-systems. Serological examination of patients in this period gives predominantly negative results. However, these results do not exclude the possibility of *Anaplasma* infection. Furthermore, the use of serological methods is not warranted in HGA seronegative variants and in the absence of a clear rise or seroconversion IgM and IgG antibodies. To verify the HGA diagnosis of paired sera (taken on the 2nd and 4th weeks of the disease) of seropositive patients are examined. That is, in cases of necessity of express-diagnosis of the HGA serological methods are not applicable.

Direct methods characterized by high sensitivity and specificity, but also have some flaws. For isolation the pathogen blood samples must be taken in the acute phase of the disease when the concentration of neutrophils reaches a maximum level. The culture method of HGA diagnosis is complicated, requires special deficient cell cultures, expensive culture media. Study duration is from two to three weeks.

The most rapid and accurate diagnostic information in the acute phase of the disease a polymerase chain reaction (PCR) with primers for DNA section 16S rRNA subunit is provided. PCR is recommended during all acute period of the disease. However, PCR is not standardized. Its sensitivity and specificity are changed depending on the test material. For the effective practical approbation use of PCR on a representative clinical material it is necessary to determine the conditions.

Microscopic method (blood smear) is identifying intracytoplasmic morulae (microcolonies of *Anaplasma*) in neu-

А.В. Руденко, С.П. Пасечніков,
М.В. Мітченко, О.М. Корніліна

Етіологічна діагностика та клінічний статус жінок, хворих на гострий пієлонефрит

ДУ "Інститут урології НАМН України",
м. Київ, Україна

trophils of peripheral blood smears, stained by Romanowsky–Giemsa. The diagnostic sensitivity of microscopic method according to different authors varies considerably: from 2 to 75%. Low efficiency of the method may insufficient or caused by Anaplasma in immunocompetent patients or insufficient skill level of experts. Thus, for each of the laboratory diagnosis methods both advantages and disadvantages are characterized. The optimum is to use several techniques (in particular, PCR and ELISA) for laboratory diagnostics. Effectiveness of a particular method depends on the test material and compliance of the optimum period of its collection (corresponding stage of the disease).

At present time, in Ukraine there is insufficient supply of equipment and lack of certified test systems of PCR, ELISA, IFA. In these conditions, more acceptable method of diagnosis for Ministry of Health of Ukraine practical institutions can be microscopy technique (blood smear). Great advantage of this method is possibility of early statement of the diagnosis. Morulae are visualized during the acute phase of infection, and even in the first week of the disease. Results of many researchers show that when the qualified expert reveals characteristic inclusions of morulae in the peripheral blood smear, a diagnosis HGA can be delivered more quickly than using PCR.

To determine the possibility of further application in clinical practice of Ukraine the study conducted its evaluation in comparison with the most common test — ELISA. Simultaneously, 32 patients were examined by microscopy and ELISA ("Omnix", St. Petersburg, Russia) techniques. The number of positive samples using the method of microscopy was 1,6 times greater than the ELISA. Morulae in 14 (43,8%) and specific antibodies in 9 (28,1%) were detected. Positive results of microscopy in ELISA for 50% (7 of 14) of cases were confirmed. The sensitivity of microscopy compared with ELISA was equal to 77,8%, and specificity was equal to 60,9%. It is shown that the level of sensitivity and specificity of the microscopy method is similar to ELISA, which has no principal advantages.

Thus, the use of only one method is inadequate and does not provide reliable information about the HGA disease. This will make efficient use of diagnostic test systems and more clearly interpret the results. Peripheral blood smear may be the method of choice in the first stage of the study the prevalence and morbidity of HGA was stained by Romanowsky–Giemsa. This method can also be used for differential diagnosis of tick-borne infections in endemic areas.

Key words: granulocytic anaplasmosis of a man, laboratory diagnostics, microscopy, enzyme immunoassay, polymerase chain reaction, Ukraine.

Проблема патології нирок та сечовивідних шляхів продовжує звертати на себе велику увагу. Це пов'язано з високою розповсюдженістю захворювань сечової системи, серед яких пієлонефрит займає провідне місце, схильністю запального процесу до хронічного, прогресуючого перебігу та нерідким розвитком ниркової недостатності. Серед населення України за даними на 2012 р. захворюваність інфекцій нирок дорівнювала 1666,5 на 100 тис. населення, серед дорослих старше 18 років цей показник склав 1808,3 випадків, доля працездатного населення становила 1448,1 випадків [4].

У виникненні і розвитку пієлонефриту певну роль відіграють різні фактори, серед яких провідне значення мають вид збудника, шляхи його проникнення в нирку та стан локального імунітету [2].

Найбільш частими збудниками, які викликають запальний процес у нирках, є кишкова паличка (*Escherichia coli*, до 65–75%), протеї (*Proteus spp.*, до 8%), клебсієла (*Klebsiella spp.*, до 8%), синьогнійна паличка (*Pseudomonas aeruginosa*), ентерококки (*Enterococci*, до 3%), стафілококи (*Staphylococci* до 3%) [3]. Часто спостерігаються асоціації декількох мікроорганізмів. До збудників, що можуть бути чинниками пієлонефриту, відносять також *Mycoplasma hominis* та *Ureaplasma spp.*, які об'єднують під терміном молекути. Останні обумовлюють тривалий, рецидивуючий перебіг хвороби. Етіологічна роль *M. hominis* була встановлена ще в 70-х роках минулого століття групою датських вчених під керівництвом А.С. Thomsen [12] і підтверджена нашими клініко-експериментальними дослідженнями [7, 8].

Міко- та уреаплазми можуть передаватися статевим шляхом (до 92% спостережень). При мікоплазменій інфекції пієлонефрити у жінок часто супроводжуються циститами. Але відомо, що останні контамінують статеві шляхи приблизно у 15% умовно-здорових людей і не ви-