

УДК: 616.98-079.4

*О.Н. Домашенко, Т.И. Черкасова, Т.И. Колесникова, Л.В. Небесная***СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ИЕРСИНИОЗА***Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького
Центр лабораторной медицины «Био-лайн»*

Реферат. В статье приведены результаты многолетнего обследования 250 больных генерализованной формой иерсиниоза. Бактериологическим методом при спорадическом иерсиниозе (218 пациентов) в 1 случае (0,46 %) диагноз подтвержден гемокультурой, в 65 (29,8 %) — копрокультурой, во время водной вспышки иерсиниоза возбудитель выделен из кала у 5 из 32 заболевших (15,6 %), Серологические методы исследования позволили подтвердить диагноз генерализованной формы иерсиниоза в поздние сроки заболевания у 87,6 % больных реакцией непрямой гемагглютинации, у 80,6 % — реакцией агглютинации. Иммунодиагностические тесты позволяют диагностировать иерсиниоз в первые дни заболевания (реакция коагглютинации), а также при формировании затяжных, хронических, вторично-очаговых форм (реакция непрямой иммунофлюоресценции, Вестерн-блот).

Ключевые слова: иерсиниоз, лабораторная диагностика

Иерсиниоз — широко распространенный сапрозоонозный бактериоз, вызываемый *Yersinia enterocolitica*. Природным резервуаром *Y. enterocolitica* является почва. Источником заражения для людей — сельскохозяйственные и домашние животные, реже — грызуны. Редко источником заражения может быть больной человек и бактериовыделитель *Y. enterocolitica*. Фекально-оральный механизм заражения иерсиниоза реализуется пищевым, водным и бытовым путями. Обычно человек инфицируется при употреблении продуктов животноводства, контаминированных *Y. enterocolitica* (молока, молочных продуктов, мяса, тушек цыплят, яиц), а также овощей и фруктов, которые употребляются в пищу в сыром или недостаточно термически обработанном виде, длительное время сохраняющихся при низких температурах [1]. Водный путь заражения при иерсиниозе встречается реже, наблюдается при употреблении загрязненной воды колодцев, открытых водоемов, природных источников, в отдельных случаях — водопроводной воды. Так, в 2002 г. в небольшом городе Донецкой области наблюдалась водная вспышка иерсиниоза (32 заболевших), обусловленная инфицированием водопроводной воды *Y. enterocolitica* [2]. Иерсиниоз регистрируется повсеместно в виде спорадических случаев и эпидемических вспышек. Для спорадического иерсиниоза характерен незначительный весенний и

выраженный осенне-зимний подъем заболеваемости [3]. Клинически иерсиниоз характеризуется исключительным многообразием синдромов, нередко системного характера, что в сочетании со сложностью лабораторного подтверждения диагноза объясняет актуальность данной проблемы не только для инфекционистов, но и врачей смежных специальностей (терапевты, гастроэнтерологи, хирурги, ревматологи, дерматологи, аллергологи и т.д.) [4, 5]. Разнообразие проявлений иерсиниоза обуславливает важность лабораторного подтверждения диагноза. Своевременная лабораторная диагностика заболевания является залогом полного выздоровления, а также предупреждения рецидивов и хронизации заболевания. Целью работы являлся анализ эффективности различных методов лабораторной диагностики иерсиниоза.

Материал и методы исследований. С 1988 г. нами обследовано 250 больных генерализованной формой иерсиниоза (138 мужчин и 112 женщин), в том числе 32 во время эпидемической вспышки заболевания. Среди остальных 218 больных преобладали единичные, не связанные друг с другом случаи и только у 11,5 % в семьях заболело 2–3 человека одновременно. Возраст больных был от 15 до 68 лет, преобладали молодые люди и лица среднего возраста. Обследование больных генерализованной формой иерсиниоза осуществляли бактериологическим методом, постановкой серологических реакций непрямой гемагглютинации и агглютинации (РНГА и РА), у 64 пациентов спорадическим иерсиниозом — реакцией коагглютинации (РКоА). Кроме этого, у 87 больных с реактивным артритом диагностика иерсиниозной этиологии заболевания осуществлялась реакцией непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ) с использованием тест-системы производства EUROIMMUN AG (Германия). С целью выявления иерсиниоза методом иммуноблотинга (Вестерн-блот) обследовано 104 больных с применением тест-системы EUROIMMUN AG (Германия).

Результаты и обсуждение. В диагностике инфекционных заболеваний бактериологи-

ческое подтверждение играет неоспоримую роль [6]. Бактериологическое исследование испражнений больных проводилось у всех больных спорадическим иерсиниозом, а также при водной вспышке заболевания. Исследуемый материал (фекалии, моча, смыва с задней стенки глотки, сгусток крови, мокрота, желчь, ликвор, операционный материал и др.) засевают на жидкую питательную среду накопления, в качестве которой использовали фосфатно-буферный раствор с pH 7,6–7,8. В пробирки с 5 мл жидкой среды вносили материал и выдерживали в холодильнике при температуре 3–4 °С в течение 15 суток, каждые 5 дней делая высевы на плотные среды Эндо, Серова, с бромтимоловым синим. Видовую принадлежность выделенных культур устанавливали на основании комплексов типичных морфологических, культуральных, биохимических, антигенных и других свойств. Окончательный ответ бактериологического исследования можно получить спустя 17–21 суток. Оптимальные сроки забора материала — первые 7–10 дней болезни. Бактериологическая диагностика при иерсиниозе имеет низкую результативность (10–25 %) [7]. Во время водной вспышки иерсиниоза возбудитель выделен из кала у 5 из 32 заболевших (15,6 %). При бактериологическом обследовании больных спорадической формы иерсиниоза (218 пациентов) возбудитель в 1 случае (0,46 %) выделен из крови, в 65 (29,8 %) — из испражнений. Таким образом, бактериологический анализ трудоемок и длителен, крайне редко удается получить культуру *Y. enterocolitica* из материала больных с затяжным течением и вторично-очаговыми формами иерсиниоза [8], поэтому особое значение в диагностике иерсиниоза приобретают иммунодиагностические методы, которые позволяют обнаружить антигены *Y. enterocolitica* в клиническом материале до 10-го дня от начала болезни (иммуноферментный анализ (ИФА), реакция коагуляции (РКоА), реакция иммунофлуоресценции (РИФ), реакция непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ), реакция агглютинации и лизиса (РАЛ) [8–12].

В качестве экспресс-метода в диагностике иерсиниоза мы использовали РКоА с помощью тест-систем Санкт-Петербургского НИИ им. Пастера. РКоА основана на определении бактериального антигена в различных биологических жидкостях (кровь, слюна, моча, копрофильтрат) на принципе соединения белка А золотистого стафилококка с Fc-фрагментом иммуноглобулинов человека. При этом Fab-фрагменты антител остаются свободными для реакции с гомологичными антигенами. Белок А имеет сродство к Fc-фраг-

менту иммуноглобулинов, поэтому такие бактерии, обработанные иммунной диагностической сывороткой неспецифически адсорбируют антитела сыворотки, которые затем взаимодействуют активными центрами с соответствующими микробами, выделенными от больных. В результате коагуляции образуются хлопья, состоящие из стафилококков, антител диагностической сыворотки и определяемого микроба. Использование РКоА эффективно в ранние сроки заболевания (до 90 % положительных результатов получено на 1-й неделе заболевания), но малоэффективно при обследовании пациентов на 2 неделе болезни и позже [9]. С помощью РКоА было обследовано 64 пациента иерсиниозом (спорадические случаи). Применение РКоА в первые 5–6 дней от начала заболевания позволило уточнить этиологию заболевания в 84,4 % случаев. Наиболее часто антигены *Y. enterocolitica* определялись в слюне (71,9 %) и копрофильтатах (60,9 %), реже — в крови (28,1 %) и моче (37,5 %). У 29 (53,7 %) больных иерсиниозом обнаружен антиген O:3, у 18 (33,3 %) — антиген O:9, у 7 (13,0 %) — антиген O:5.

Для ранней диагностики иерсиниоза перспективным является РНИФ, которую используют не только для определения антигенов, но и для титрования антител. На поверхность предметных стекол наносили бактериальные мазки *Yersinia enterocolitica* (серовары O:3, O:6, O:9). Стекла инкубируют с образцами разведенной сыворотки или плазмы крови пациента. Имеющиеся в положительных образцах специфичные антитела классов IgG или IgM к *Yersinia enterocolitica* связываются с бактериальными антигенами. Связавшиеся антитела выявляют флуоресцентным окрашиванием. Характер свечения оценивается с помощью флуоресцентного микроскопа. Данным методом нами обследовано 87 больных с реактивным артритом, из них у 42 (48,3 %) выявлены IgM к *Y. enterocolitica*. Серовар O:3 определен у 38,0 %, O:6 — у 9,2 %, O:9 — у 6,9 %, при этом у 6,9 % больных обнаружены антитела к нескольким антигенам возбудителя — O:3 и O:9; O:3, O:6 и O:9.

Для определения специфических антител к антигенам *Y. enterocolitica* используют серологические методы. Широкое распространение в клинической практике получила РНГА. Метод основан на определении титра антител в сыворотках крови больных с использованием в качестве антигена липополисахарида (ЛПС) из *Y. enterocolitica* серологических вариантов O:3 и O:9 [13]. РНГА исследовалась всем больным генерализованной формой иерсиниозом. При обследовании на 1-й неделе болезни РНГА была положительной у 71

Таблица. Диагностически значимые YOP, использованные в recomLine Yersinia производства Mikrogen, Германия

Антиген	Размер (кДа)	Функция
YOP M	58	Ингибирование агрегации тромбоцитов
YOP H	46	Резистентность к фагоцитозу, цитотоксичность (?)
V-AG	38	Ингибирование TNF- α
YOP D	35	Ингибирование TNF- α
YOP N	34	Ассоциирован с Yersinia артритом (?)
YOP E	25	Цитотоксичность

больного (28,4 %) в титрах 1:200 — 1: 100 с антигеном O:3 и O:9, а нарастание титра антител на 3-й неделе отмечалось в 87,6 % случаев. Этиологическая роль серовара O:3 установлена у 91,3 % больных иерсиниозом, серовара O:9 — у 8,7 %.

Вторая реакция, основанная на определении иерсиниозных антител в сыворотке крови больных и использованная в нашем исследовании, была РА с O-H-диагностикумами (взвесь живых бактерий) в лаборатории Ростовского-на-Дону противочумного института [13]. РА исследовалась у 62 больных спорадическим иерсиниозом. У 8 (3,2 %) пациентов диагноз иерсиниоза подтвержден РА с антигенами O:2a, O:2b, O:5.27, O:10, O:10k, у 36 (58,1 %) — с антигеном O:3, у 6 (9,7 %) — с антигеном O:9.

Недостатком РНГА является типоспецифичность реакции, что не позволяет диагностировать заболевание, вызванное другими серовариантами *Y. enterocolitica*. Кроме того, титры антител достигают диагностически значимых величин в поздние сроки заболевания, т.е. на 3–4 неделе, что снижает эффективность диагностики иерсиниоза в раннем периоде болезни. Недостатком метода РА является также типоспецифичность реакции: для постановки РА необходимы эталонные штаммы *Y. enterocolitica* наиболее распространенных серовариантов (O:3, O:9, O:4.3, O:5.27 и др.). Крайне редко серологическими методами подтверждается гастроинтестинальная форма иерсиниоза (4,5 %). [10]. Однократность исследования крови серологическими реакциями не позволяет однозначно трактовать полученные результаты, диагностика иерсиниоза осуществляется при исследовании парных сывороток с интервалом 10–14 дней. По мнению некоторых авторов для повышения эффективности диагностики иерсиниоза целесообразно исследовать сыворотку крови больных иерсиниозом несколькими серологическими методами [10].

Патогенность иерсиний зависит от плазмид (нехромосомных генетических факторов) и экспрессии кодируемых на них белков. Эти бел-

ки наружной мембраны («Yersinia outer membrane proteins» — Yop) специфичны для иерсиний и не обнаружены у других бактерий. Все заболевания, вызываемые патогенными штаммами *Y. enterocolitica*, выявляются с помощью идентификации YOP-специфических антител [14–16].

Тест-системы для диагностики методом Вестерн-блота содержат тестовые стрипы с электрофоретически разделенными факторами вирулентности патогенных штаммов *Yersinia enterocolitica*. Стрипы инкубируют на первой стадии реакции с образцом разведенной сыворотки или плазмы крови пациента. В случае, если образец положительный, специфические антитела классов IgA или IgG будут связываться с соответствующими антигенами. Для обнаружения связанных антител проводим инкубацию с использованием ферментного конъюгата (антитела к IgA или IgG человека, меченные щелочной фосфатазой), который способен вызывать развитие цветной реакции. IgA, IgG антитела могут быть обнаружены в раннюю фазу после контакта с факторами вирулентности *Yersinia enterocolitica*. Титры IgA снижаются в течение нескольких месяцев. Антитела класса IgG обычно персистируют существенно дольше и могут выявляться в сыворотке через 12 месяцев и более после начального контакта с антигенами возбудителя. Для острого периода характерны нарастающие или высокие титры IgG антител. При хронических формах заболевания и иммунопатологических осложнениях антитела класса IgG и даже IgA могут обнаруживаться и в течение более длительного периода. *Y. enterocolitica* может персистировать годы в слизистой кишечника и лимфатической ткани. Персистенция возбудителя может ассоциироваться с персистенцией специфических IgA антител [16]. При скрининговом обследовании методом иммуноблотинга (Вестерн-блот) 104 больных с неуточненными заболеваниями диагноз иерсиниоза, включая хронические формы заболевания, диагностирован в 19,2 % случаев обнаружением AT-IgA к *Y. enterocolitica*, у 29,8 % больных — AT-IgG. У 12 пациентов (11,5 %) выявлены AT-IgA и AT-IgG к *Y. enterocolitica*. Профиль антител IgA и IgG к антигенам *Y. enterocolitica* представлен p.46, p.44, p.38, p.36, p.34, p.30, p.25.

Генетическим методом диагностики и типирования иерсиний является ПЦР [17]. К достоинствам ПЦР следует отнести быстроту

выполнения анализа (до 6 ч), информативность, высокую чувствительность и специфичность. Однако, являясь высокотехнологичным методом диагностики иерсиниоза (подтверждение в 99 %), ПЦР не нашла широкого практического использования в виду ее высокой стоимости и низкой технической оснащенности клинических лабораторий.

Выводы. Таким образом, в арсенале практического врача в настоящее время имеется достаточное количество методов лабораторной диагностики иерсиниоза, которые должны использоваться комплексно в соответствии с клиническими формами и периодами заболевания. Не исключая значимость традиционных методов исследования (бактериологический, серологический), необходимо помнить, что современные тесты, такие как РНИФ, иммуноблотинг, ПЦР являются более совершенными и информативными способами подтверждения диагноза в разные периоды болезни, включая иммунопатологические осложнения и хронические формы иерсиниоза.

O.N. Domashchenko, T.I. Cherkasova, T.I. Kolesnikova, L.V. Nebesnaya

MODERN METHODS OF YERSINIOSIS DIAGNOSTIC

Summary. *The results of long-term examinations of 250 patients suffering from generalized form of yersiniosis are presented in the article. By means of bacteriological method, at sporadic yersiniosis (218 patients) in 1 case (0,46 %) the diagnosis was confirmed with hemoculture, and in 65 (29,8 %) — with stool culture; at waterborne outbreak of yersiniosis the agent was excreted from feces at 5 of 32 patients (15,6 %). Serological study methods enabled to confirm the diagnosis of generalized form of yersiniosis in late periods of disease at 87,6 % of patients suffering from reaction of indirect hemagglutination and at 80,6 % of patients suffering from reaction of agglutination. Immunodiagnostic tests enable diagnosing of yersiniosis in early days of disease (reaction of co-agglutination) and also at formation of lingering, chronic, and secondary focal forms (reaction of indirect immunofluorescence, Western blot).*

Keywords: *yersiniosis, laboratory diagnostics*

ЛИТЕРАТУРА

1. Иерсинии и иерсиниозы / под. ред. Г.Я. Ценовой. – СПб., 2006. – 168 с.
2. Домашенко О.М. Характеристика водного спалаху ерсиніозу в Донецькій області / О.М. Домашенко, Т.С. Самойленко, І.І. Сошенко, В.Я. Верещагіна // Вестник гигиены и эпидемиологии. – 2002. – Т.6, № 2. – С.223-226.
3. Головчак Г.С. Епідеміологічна характеристика іерсиніозів в умовах урбанізованих територій та удо-сконалення системи епідеміологічного нагляду: Автореф. дис... канд. мед. наук: спец. 14.01.13 «Інфекційні хвороби» / Г.С. Головчак. – К., 2000. – 19 с.
4. Иерсиниозы / [Ющук Н.Д., Ценева Г.Я., Кареткина Г.Н., Бродов Л.Е.]. – М., 2003. – 265 с.
5. Шестакова И. В. Иерсиниоз: диагностические ошибки/И.В. Шестакова, Н.Д. Ющук, Т.И. Попова // Врач. – 2007. – № 7. – С. 71-74.
6. Ценева Г.Я. Биологические свойства иерсиний и лабораторная диагностика псевдотуберкулеза и иерсиниоза: пособие для врачей/ Г.Я. Ценева, Е.А. Воскресенская, Ю.Ю. Солодовникова. – СПб., 2001. – 60 с.
7. Современное состояние лабораторной диагностики иерсиниозов в Москве/ Н.Н. Филатов, Н.Я. Салова, В.П. Голованова, Т.И. Шестерова //В кн.: Инфекции, обусловленные иерсиниями (иерсиниоз, псевдотуберкулез), и другие актуальные инфекции. – СПб, 2000. – С. 59-60.
8. Шестакова И.В. Хронический иерсиниоз как терапевтическая проблема/ И.В. Шестакова, Н.Д.Ющук // Тер. архив. –2010, т. 82. –№ 3. – С. 71-77.
9. Использование реакции коаггутинации в диагностике иерсиниозов у детей/ Е.М. Климанова, О.Ф. Белая, К.В. Лаврова [и др.] // Педиатрия. –1993. – №4. – С. 48-49.
10. Ющук Н. Д. Проблемы лабораторной диагностики иерсиниозов и пути их решения/ Н.Д. Ющук И.В. Шестакова // ЖМЭИ. – 2007. – № 3. – 61-66.
11. Александр С.К. Приготовление IgG диагностикума на основе окрашенных полиакролеиновых латексов для применения в реакции латексной агглютинации/ С.К. Александр , Ю.В. Лукин, Л.М. Фидлер // ЖМЭИ. – 1990. – № 6. – С. 84-88.
12. Малов И.В., Рубцов И.В., Ющенко Г.В., Леоненко В.В. Способ иммуноферментной диагностики иерсиниозов // Патент SU 1767435 А 1 от 1992. 10.07.
13. Королук А.М. Серологическая диагностика кишечного иерсиниоза. Конструирование стабильного эритроцитарного препарата для реакции непрямой гемагглютинации / А.М. Королук, С.Н. Головачева, М.В. Дулатова // ЖМЭИ. – 1990. – №3. – С. 30-34.
14. Кокорина Г.И. Генотипы штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* и их клиническое и диагностическое значение: дис. на соискание науч. степени кан. мед. наук : 03.02.03 «Микробиология» / Г.И. Кокорина. – СПб, 2013. – 133 с.
15. Смирнов И.В. Возбудитель иерсиниоза и близкие к нему микроорганизмы/И.В. Смирнов // Клин. микробиол., антимикроб. химиотерапия. – 2004, Т. 6. – № 1. – С. 10-21.
16. Кокорина Г.И. Применение иммуноблота в диагностике затяжных форм иерсиниозов и изучение вопросов патогенеза (обзор литературы) / Г.И. Кокорина, О.А. Шендерович, Г.Я. Ценева // Клин. лабор. диагн. – 2006. – № 4. – С. 40-44.
17. Малышева Е.Б. Значение метода ПЦР в диагностике иерсиниоза: новые технологии в оценке эффективности лечения и прогноза/ Е.Б. Малышева, Е.Д. Московкина, О.М. Волнова [и др.] // Генодиагностика в современной медицине: тез. докл. 3-й Всеросс. научн. - практ.конф. – Москва, 2000. – С. 169.