

УДК 616.98:579.881.2

А.В. Бондаренко

Харьковский национальный медицинский университет

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА БАРТОНЕЛЛЁЗА

Приведены результаты оценки современных методов этиологической диагностики бартонеллёза: выделение «чистой» культуры возбудителя, определение уровня специфических антибартонеллёзных иммуноглобулинов, определение бартонеллёзного антигена, детекция специфических фрагментов генома. Научно обоснована возможность, эффективность и целесообразность использования разработанных и усовершенствованных методов диагностики в клинических условиях.

Ключевые слова: бартонеллёз, диагностика, культуральный метод, реакция непрямой иммунофлуоресценции, полимеразная цепная реакция.

Микроорганизмы рода *Bartonella*, роль которых в патологии человека ранее считалась незначительной, в настоящее время вызывают всё большую обеспокоенность. Начиная с реклассификации 1993 г. род *Bartonella*, который к тому времени насчитывал лишь один вид – *B. bacilliformis*, постоянно расширяется и сейчас насчитывает около 40 видов и подвидов бактерий [1, 2]. Основная группа риска при бартонеллёзе – больные с иммунодефицитами разного происхождения, у которых заболевание без адекватного лечения является фатальным. Бартонеллы вызывают чрезвычайный полиморфизм клинических проявлений с поражением всех органов и систем хозяина [3, 4]. Подавляющее большинство случаев заболевания остаётся не диагностированным, что в последующем негативно влияет на эффективность терапии данного заболевания. В этой связи важную роль для установления правильного диагноза приобретают лабораторные исследования для выявления этиологии заболевания.

Целью работы явилась оценка современных методов этиологической диагностики бартонеллёза, включающих выделение «чистой» культуры возбудителя, определение уровня специфических антибартонеллёзных иммуноглобулинов, определение бартонеллёзного антигена и детекция специфических фрагментов генома.

«Золотым стандартом» этиологической диагностики бартонеллёза является культуральный метод. Выделение «чистой» куль-

туры бартонелл – очень сложный, длительный и нуждающийся в специальных условиях процесс. Большинство лабораторий не имеют производственных мощностей, чтобы поддерживать культуры бартонелл на протяжении длительного периода и предотвратить их контаминацию. Бартонеллы не метаболизуют соединения, входящие в состав панелей быстрых биохимических тестов, в связи с чем проблема индикации чистой культуры *Bartonella spp.* остаётся довольно сложной.

Микробиологический метод лабораторной диагностики бартонеллёза не нашел широкого применения непосредственно в медицинской практике, так как выделить возбудитель из образцов клинического материала удаётся относительно редко, и процесс этот достаточно длительный (в среднем от 12 до 16 суток).

Большинство специалистов доминирующим клиническим вариантом бартонеллёза считают болезнь от кошачьих царапин, а основным этиологическим агентом – *B. henselae*. В литературе периодически описываются новые виды бартонелл, ассоциированные с разнообразными патологическими состояниями человека (*B. vinsonii*, *B. clarridgeiae*, *B. elizabethae* и др.). Для их выделения из клинического материала и совершенствования всех этапов микробиологического метода этиологической диагностики бартонеллёза следует разработать более эффективные питательные среды.

Нами показано, что при применении качественных питательных сред (оптимизированный шоколадный агар) и соблюдении оптимальных условий их выращивания всегда удаётся выделять изоляты бартонелл из клинического материала [5]. Высокую частоту выделения *Bartonella spp.* из исследованных образцов от пациентов с болезнью от кошачьих царапин и бациллярным ангиоматозом можно объяснить предварительным тщательным отбором нами «тематических» больных. Все они имели чётко установленный клинический диагноз, а форма заболевания у них была типичной. Кроме того, высеив на питательные среды образцов клинического материала осуществляли непосредственно после их отбора.

Несмотря на имеющиеся данные о способности бартонелл давать рост на кровяном агаре, в подавляющем большинстве исследованных штаммов нами не выявлена такая способность. В наших экспериментах лишь типовой штамм *B. henselae* CCUG 30454 BT на протяжении 14 суток выращивания давал слабый рост, а клинические штаммы *Bartonella spp.* не образовывали видимых невооружённым глазом макроколоний на кровяном агаре на протяжении 24 суток их культивирования в атмосфере с 5%-ным CO₂ при температуре (35±0,5)°C [5].

Морфологические, тинкториальные, культуральные и биохимические свойства выделенных из клинического материала культур бартонелл в целом были подобны свойствам типового штамма *B. henselae*, но были зафиксированы и некоторые отличия в размерах клеток и морфологии макроколоний. При световой микроскопии в препарате, изготовленном из одного и того же штамма *Bartonella spp.*, определяется полиморфизм клеток: прямые или слегка согнутые палочки, а также коккопалочки длиной 0,7–1,8 мкм и диаметром 0,5–0,7 мкм. Концы палочковидных клеток были как закруглёнными, так и заострёнными [5].

В препаратах, изготовленных из типового штамма *B. henselae* и клинических изолятов *Bartonella spp.*, клетки бактерий хорошо окрашивались при использовании методов Здродовского (в рубиново-красный цвет), Романовского–Гимзы (в сине-голубой цвет), Гименца (в ярко-красный цвет), посеребрения по Warthin–Starry в модификации Морозова (в светло- и тёмно-коричневый цвет). Наименее выраженное окрашивание клеток бар-

тонелл отмечено при использовании метода Романовского–Гимзы, а наиболее качественное – при серебрении по Warthin–Starry. Окрашивание клеток бартонелл по Граму не даёт стабильных, однотипных, чётких результатов, несмотря на то, что эти бактерии описывают и грамтрицательные палочки и коккопалочки. В препаратах, окрашенных по Граму, в одном и том же поле зрения наблюдали клетки, политипно окрашенные в красный и сиренево-красный цвет [5].

Хорошо известно, что штаммы бартонелл характеризуются высокой прихотливостью к питательным средам. По результатам наших исследований, эти микроорганизмы не росли на подавляющем большинстве питательных сред, наиболее широко применяемых в практике бактериологических лабораторий для диагностики инфекционных заболеваний. Оптимизированный шоколадный агар, изготовленный нами на основе агара с сердечно-мозговым экстрактом, обеспечивал более быстрый рост типового и клинических штаммов бартонелл. Это позволило сократить длительность инкубации первичных и повторных высеив для образования видимых невооружённым глазом макроколоний *Bartonella spp.* с 14–16 до 10–12 суток [5].

Кроме типичных форм макроколоний, описанных в зарубежной научной литературе, у двух клинических штаммов *Bartonella spp.* наблюдали совсем другие, не описанные ранее типы макроколоний в форме веретенообразных кристалликов длиной 0,3–1,3 мм и шириной в центральной зоне 0,1–0,5 мм. Колонии имели гладкую поверхность с чёткими краями, полупрозрачный желтоватый цвет и при боковом освещении давали яркий отблеск в центральной и периферических зонах.

При внесении в питательные среды (оптимизированный шоколадный агар и агар с сердечно-мозговым экстрактом) апробированных нами ингредиентов (гемин, стимулятор роста чумного микроба, смесь продуктов ферментативного гидролиза дрожжей) лишь стимулятор роста чумного микроба существенно стимулировал рост *Bartonella spp.*, что позволило ускорить формирование видимых невооружённым глазом макроколоний на 5 суток. А использование агара с сердечно-мозговым экстрактом с добавлением стимулятора роста чумного микроба, благодаря сохранению прозрачности этой среды, создаёт преимущества для изучения

характеристик макроколоний в пронизывающем свете.

Результаты выполненных нами исследований подтверждают данные других авторов относительно потребностей бартонелл в X- и V-факторах для их роста. В соответствии с биохимической активностью бартонеллы следует отнести к биохимически инертным группам бактерий. Все исследованные нами штаммы *Bartonella spp.* были оксидазо-, каталазо- и уреазонегативными, не восстанавливали нитраты в нитриты, не образовывали сероводорода при расщеплении белков, не ферментировали углеводы и липиды, выявляли умеренную пептидазную активность [6].

Результаты определения чувствительности выделенных нами штаммов бартонелл к антимикробным препаратам совпадают с общепризнанным положением о том, что эта группа бактерий в целом характеризуется достаточно высокой чувствительностью к большинству антибиотиков, широко используемых в медицинской практике [7]. Однако данные о чувствительности бартонелл к антимикробным препаратам разных химических групп чрезвычайно противоречивы. Чаще всего расхождения касаются вопроса чувствительности бартонелл к действию антибиотиков групп β -лактамов, макролидов и тетрациклинов. Пенициллины не нашли широкого применения в терапии бартонеллёзов, но результаты наших исследований показали, что культуры *Bartonella spp.* в 100 % случаев чувствительны *in vitro* к пенициллинам, аминопенициллинам, карбоксипенициллинам. Достаточно часто для лечения болезни от кошачьих царапин специалисты предлагают применять цефалоспорины. Нами показана вариация чувствительности бартонелл к разным препаратам этой группы. Все исследованные штаммы оказались чувствительными к цефалексину, цефазолину, цефаклору, цефтриаксону, но 71 % этих штаммов оказался резистентным к цефотаксиму [7]. Полученные данные свидетельствуют о высокой (100%-ной) чувствительности бартонелл к рифампицину, что согласуется с клинической эффективностью препарата при болезни от кошачьих царапин, но его применение не рекомендуется в качестве монотерапии бартонеллёза в связи с быстрым приобретением микроорганизмами резистентности.

Традиционные рекомендации относительно применения эритромицина при бартонеллёзе базируются на его эффективности

при бациллярном ангиоматозе, тогда как при болезни от кошачьих царапин терапевтическая эффективность эритромицина не подтверждена ни в одном исследовании. Кроме того, эритромицин имеет существенный недостаток – быстрое формирование микробной резистентности. Единственным антибактериальным препаратом, клиническая эффективность которого была установлена в ходе двойного слепого плацебоконтролируемого исследования при лечении неосложнённой болезни от кошачьих царапин у иммунокомпетентных пациентов, является азитромицин. Кроме уменьшения длительности лимфаденита, других отличий при сравнении с пациентами, не получавшими антибактериальную терапию, нами не найдено.

Исследованные штаммы *Bartonella spp. in vitro* характеризовались резистентностью к эритромицину в 57 %, к кларитромицину – в 29 %, к азитромицину – в 43 %, к тетрациклину – в 14 % [7]. Эти данные противоречат данным об относительной клинической эффективности применения указанных препаратов для лечения бартонеллёза. Учитывая расхождение между результатами определения эффективности антибиотиков *in vitro* и *in vivo*, можно допустить, что клинические проявления болезни, вероятно, обусловлены не микроорганизмами, а иммунопатологическими реакциями, опосредованными антигенами бартонелл. Указанное обесценивает изучение антибиотико-чувствительности клинических изолятов бартонелл.

Изготовленные нами из клинического штамма *B. henselae* ЛНМІЗ 06U054 тест-системы для выявления бартонеллёзного антигена [8] и антибартонеллёзных иммуноглобулинов [9] в реакции непрямой иммунофлуоресценции характеризовались высоким уровнем чувствительности, специфичности и воспроизводимости результатов. Так, тестирование образцов при использовании экспериментальной тест-системы для выявления бартонеллёзного антигена выявило чувствительность со штаммом ЛНМІЗ 06U054 – $(1,3 \pm 0,7) \cdot 10^5$ корпускул антигена/мл, а при использовании других штаммов *B. henselae* относительно показателя для штамма ЛНМІЗ 06U054 – $(72 \pm 6)\%$; специфичность – $(92 \pm 3)\%$, воспроизводимость – $(95 \pm 5)\%$. Чувствительность при использовании антибартонеллёзных иммуноглобулинов кролика, гомологичных штамму ЛНМІЗ 06U054, была на

уровне $(0,2 \pm 0,03)$ мг антител/мл, а при использовании негомологичных штамму ЛНМІЗ 06U054 антибартофельзных сывороток и иммуноглобулинов относительно показателя для антибартофельзных иммуноглобулинов кролика составила $(67 \pm 8)\%$. Специфичность была на уровне $(91 \pm 4)\%$, воспроизводимость – $(95 \pm 5)\%$.

Тест-системы имеют короткий срок годности и потому не являются экономически выгодными для лабораторий с малой мощностью; для визуализации реакций нужны флуоресцентные микроскопы. Кроме того, было установлено, что бартофельлы имеют кроссреактивность с *Coxiella burnetii*, *Rickettsia spp.*, *Escherichia spp.* [10], что в некоторых случаях затрудняет диагностику. Субъективность метода очень важна, поэтому рекомендовано считывание результатов двумя операторами, что тоже является ограничивающим фактором, учитывая короткий срок флуоресценции. Преимущества реакции непрямой иммунофлуоресценции включают лёгкость в применении, быстроту тестирования, удобность использования комплектов тест-систем.

Применение праймерных систем *rpoB* и *pap31* обеспечивает близкий уровень результативности детекции *B. henselae* в полимеразной цепной реакции (ПЦР). Испытание ПЦР на модельных образцах с суспензиями бактерий и корпускулярного диагностикума штаммов микроорганизмов гомологичных видов при использовании праймера *rpoB* выявило чувствительность – $(8,1 \pm 3,5) \cdot 10^4$ КУЕ /мл или $(6,3 \pm 1,9) \cdot 10^5$ бактериальных клеток/мл, а при использовании праймера *pap31* для штаммов *B. henselae* – $(9,8 \pm 5,6) \cdot 10^3$ КУЕ/мл или $(1,4 \pm 1,2) \cdot 10^5$ бактериальных клеток /мл, а для корпускулярного диагностикума *B. quintana* – $(8,6 \pm 1,4) \cdot 10^5$ бактериальных клеток/мл. Специфичность *rpoB* составила $(74,1 \pm 9,9)\%$, *pap31* для штаммов *B. henselae* и корпускулярного диагностикума *B. quintana* – $(83,3 \pm 8,3)\%$. Воспроизводимость *rpoB* была на уровне $(81,3 \pm 6,3)\%$, *pap31* для штаммов *B. henselae* и корпускулярного диагностикума *B. quintana* – $(89,9 \pm 3,3)\%$.

Параллельное применение обеих праймерных систем обеспечивает возможность дифференцировать виды *B. henselae* и *B. quintana* [11]. ПЦР в современных условиях стала достойным выбором, хотя доступность по цене относительна. Много усилий направ-

лено на разработку ПЦР в реальном времени и секвенирование ампликонов ДНК бартофельл.

Выводы

1. Бартофельлы характеризуются высокой прихотливостью к питательным средам и условиям культивирования. Применение оптимизированного шоколадного агара с добавлением стимулятора роста чумного микроба, соблюдение общепринятых правил асептики, отбора и посева образцов клинического материала, оптимальных условий выращивания высевов позволяет с высокой частотой выделять от больных бартофельлезом изоляты *Bartonella spp.* при выращивании на протяжении 5–10 суток.

2. Изучение биологических свойств клинических изолятов *Bartonella spp.* показало, что по морфологическим, тинкториальным и биохимическим свойствам культуры *Bartonella* являются монотипными и не отличаются от референтного штамма *B. henselae* CCUG 30454 BT (CDC G5436, ATCC 49882, CIP 103737). Поскольку бартофельлы являются ферментативно инертными и не метаболизируют соединения, входящие в биохимические тестовые панели, идентификация их в условиях бактериологических лабораторий очень сложна.

3. Изучение антибиотикочувствительности клинических изолятов бартофельл *in vitro* нецелесообразно, поскольку полученный результат не может предусмотреть эффективность терапии, так как установленная клиническая эффективность макролидов, тетрациклинов и ансамицинов определяется в большей степени их противовоспалительным и антиангиогенным действиями, чем антимикробной активностью.

4. Использование экспериментальной тест-системы для выявления бартофельлезного антигена в реакции непрямой иммунофлуоресценции позволяет проводить лабораторные исследования с уровнем чувствительности $(1,3 \pm 0,7) \cdot 10^5$ корпускул антигена/мл, специфичности – $(92 \pm 3)\%$, воспроизводимости – $(95 \pm 5)\%$, а использование тест-системы для определения антибартофельльных антител – $(0,2 \pm 0,03)$ мг антител/мл, $(91 \pm 4)\%$ и $(95 \pm 5)\%$ соответственно.

5. Применение праймерных систем *rpoB* и *pap31* обеспечивает близкий уровень результативности метода полимеразной цепной реакции для детекции *B. henselae* со специ-

фичністю 74,1–83,3 %, чутливістю (1,4–6,3)·10⁵ бактеріальних кліток/мл, воспроизводимістю 81,3–89,9 %. Експериментально підтверджена видова специфічність указаних праймерних систем: *groV* для

ідентифікації *B. henselae*, а *pap31* – для *B. henselae* і *B. quintana*. Паралельне застосування обох праймерних систем забезпечує можливість диференціювати види *B. henselae* і *B. quintana*.

Список літератури

1. Emerging Bartonella in humans and animals in Asia and Australia / W. Saisongkroh, J.M. Rolain, Y. Suputtamongkol, D. Raoult // J. Med. Assoc. Thai. – 2009. – Vol. 92, № 5. – P. 707–731.
2. Bartonellosis / K.A. Hammoud, R.H. Daniel, B. Edwards [et al.] // Medicine-Medical Reference. – Updated: Dec. 23, 2010. – Mode of access: <http://emedicine.medscape.com/article/213169-overview>.
3. Florin T.A. Beyond cat scratch disease: widening spectrum of Bartonella henselae infection / T.A. Florin, T.E. Zaoutis, L.B. Zaoutis // Pediatrics. – 2008. – Vol. 121, № 5. – P. 1413–1425.
4. Seroprevalence for Bartonella spp. infection in HIV patients in Catalonia, Spain / I. Pons, I. Sanfeliu, M.M. Nogueras [et al.] // BMC Infect. Dis. – 2008. – № 8. – P. 58.
5. Бактеріологічний метод діагностики бартонельозної інфекції / А.В. Бондаренко, С.І. Похил, О.В. Бондаренко [та ін.] // Лабораторна діагностика. – 2007. – № 2 (40). – С. 51–56.
6. Бондаренко А.В. Дослідження біохімічних властивостей Bartonella spp. / А.В. Бондаренко // Проблеми сучасної медичної науки та освіти. – 2010. – № 4. – С. 48–50.
7. Бондаренко А.В. Вивчення чутливості збудників бартонельозу до антибактерійних препаратів / А.В. Бондаренко // Annals of Mechnikov Institute. – 2010. – № 3. – С. 45–48. – Режим доступу до журн.: <http://www.imiamn.org.ua/journal.htm>.
8. Результати випробування експериментальної РНІФ-тест-системи для виявлення бартонельозного антигену / А.В. Бондаренко, С.І. Похил, О.В. Бондаренко, О.М. Тимченко // Проблеми безперервної медичної науки та освіти. – 2011. – № 1. – С. 51–53.
9. Испытание экспериментальной тест-системы для определения антибартофельных иммуноглобулинов / Е.В. Бондаренко, А.В. Бондаренко, С.И. Похил, В.В. Красовский // Профилактика медицина. – 2008. – № 4. – С. 38–42.
10. Evaluation of sensitivity, specificity and cross-reactivity in Bartonella henselae serology / M.J. Vermeulen, H. Verbakel, D.W. Notermans [et al.] // J. Med. Microbiol. – 2010. – Vol. 59, № 6. – P. 743–745.
11. Використання полімеразної ланцюгової реакції для діагностики бартонельозної інфекції / А.В. Бондаренко, С.І. Похил, В.М. Козько, Д.В. Кацапов // Експерим. і клін. медицина. – 2011. – № 1 (50). – С. 128–130.

А.В. Бондаренко

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА БАРТОНЕЛЬОЗУ

Наведені результати оцінки сучасних методів етіологічної діагностики бартонельозу: виділення «чистої» культури збудника, визначення рівня специфічних антибартофельних імуноглобулінів, визначення бартонельозного антигену, детекція специфічних фрагментів геному. Науково обґрунтована можливість, ефективність і доцільність використання розроблених і вдосконалених методів діагностики в клінічних умовах.

Ключові слова: бартонельоз, діагностика, культуральний метод, реакція непрямой імунофлуоресценції, полімеразна ланцюгова реакція.

А.В. Bondarenko

LABORATORY DIAGNOSTICS OF BARTONELLOSIS

Results of estimation of modern methods of bartonellosis etiologic diagnostics (isolation of «pure» culture of causative agent, determination of level of specific anti-Bartonella immunoglobulins, determination of Bartonella antigen, detection of genome specific fragments) are presented. The possibility, efficiency and practicability of the usage of the worked out and improved methods are scientifically substantiated in clinical conditions.

Key words: bartonellosis, diagnostics, cultural method, reaction of indirect immunofluorescence, polymerase chain reaction.

Поступила 22.11.13