

УДК 616.995.1:577.2

<https://doi.org/10.31016/978-5-6050437-8-2.2024.25.405-411>

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ПЦР ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК ВОЗБУДИТЕЛЯ КИСТОЗНОГО ЭХИНОКОККОЗА В КРОВИ

Теличева В. О.¹,

биолог клиники инфекционных и паразитарных болезней,
telichevaviktoriya@yandex.ru

Нагорный С. А.¹,

кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник
лаборатории санитарно-паразитологического мониторинга,
медицинской паразитологии и иммунологии

Ермакова Л. А.¹,

кандидат медицинских наук,
заведующая клиникой инфекционных и паразитарных болезней

Головченко Н. В.¹,

врач клинической лабораторной диагностики
клиники инфекционных и паразитарных болезней

Корниенко И. В.²,

доктор биологических наук, главный научный сотрудник

Киртанасова Е. Я.³,

хирург

Аннотация

Эхинококкозы остаются сложной мультидисциплинарной проблемой. В связи с частыми осложнениями интра- и послеоперационными, отдаленными рецидивами эхинококкозов, успех лечения больного зависит от взаимодействия врачей хирургического и терапевтического профилей. До настоящего времени в Российской Федерации отсутствует единое мнение о тактике ведения больных эхинококкозами. Отсутствуют протоколы и клинические рекомендации

¹ Федеральное бюджетное учреждение науки «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Роспотребнадзора (344000, Россия, г. Ростов-на-Дону, пер. Газетный, д. 119)

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук» (344006, Россия, г. Ростов-на-Дону, пр. Чехова, д. 41)

³ Государственное учреждение здравоохранения «Областная клиническая больница № 2» (344065, Россия, г. Ростов-на-Дону, ул. 1-й Конной Армии, д. 33)

по выбору объема и способа хирургического вмешательства, длительности курсов противорецидивной терапии. В настоящее время основным лабораторным методом оценки эффективности хирургического и противорецидивного лечения является иммуноферментный анализ (ИФА) с целью выявления IgG к антигенам однокамерного эхинококка. Во время роста кисты титры антител могут сильно варьировать, давать перекрестные реакции. Поэтому актуальным остается поиск диагностических методов, позволяющих оценить риски развития рецидивов инвазии для определения длительности антигельминтной терапии. Методом ПЦР с помощью разработанных нами пар праймеров, условий выделения и режима амплификации исследованы гидатидозная жидкость, полученная при PAIR, осложнившейся анафилактическим шоком, а также парные образцы крови больной, отобранные в течение 12 часов после анафилактического шока и через месяц антигельминтной терапии. В содержимом кисты и пробах крови больной, полученной во время оперативного вмешательства и через месяц после противорецидивной терапии, методом ПЦР обнаружена ДНК эхинококков. Молекулярно-генетический метод исследования может служить инструментом в диагностике КЭ в качестве дополнительного к гистологическому. Контаминация крови и других полостей и органов при оперативном вмешательстве имеет важное значение для определения тактики дальнейшего ведения больных эхинококкозами.

Ключевые слова: *Echinococcus* spp., *Echinococcus granulosus*, *Echinococcus multilocularis*, ПЦР

APPLICATION OF THE PCR METHOD TO DETECT DNA OF THE CAUSATIVE AGENT OF CYSTIC ECHINOCOCCOSIS IN THE BLOOD

Telicheva V. O. ¹,

Biologist of the Clinic of Infectious and Parasitic Diseases,
telichevaviktoriya@yandex.ru

Nagorniy S. A. ¹,

Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher
of the Laboratory of Sanitary and Parasitological Monitoring,
Medical Parasitology and Immunology

Ermakova L. A. ¹,

Candidate of Medical Sciences,
Head of the Clinic of Infectious and Parasitic Diseases

¹ Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology (119, Gazetnyy alley, Rostov-on-Don, 344000, Russia)

Golovchenko N. V.¹,Medical Doctor of the Clinical Laboratory Diagnostics
of the Clinic of Infectious and Parasitic Diseases**Kornienko I. V.**²,

Doctor of Biological Sciences, Chief Researcher

Kirtanasova E. I.³,

Surgeon

Abstract

Echinococcosis remains a complex multidisciplinary problem. Due to frequent intra- and postoperative complications, and distant recurrence of echinococcosis, the successful treatment of the patient depends on interaction of doctors in surgery and therapeutics. To date, there has been no consensus in the Russian Federation on management tactics of echinococcosis patients. There are no protocols or clinical guidelines to choose a surgical intervention volume and method or the duration of anti-relapse treatment courses. Currently, the main laboratory method to evaluate the effectiveness of surgical and anti-relapse treatment is enzyme immunoassay (ELISA) to detect IgG responses to unilocular echinococcus antigens. During cyst growth, antibody titers can vary greatly and initiate cross-reactions. Therefore, a search remains relevant for diagnostic methods that allow assessing infection recurrence risks to determine the anthelmintic therapy duration. The PCR method using our developed primer pairs, isolation conditions, and the amplification mode, studied hydatid cyst fluid obtained by the PAIR with anaphylactic shock as a complication, as well as matched blood samples of the patient taken within 12 hours after anaphylactic shock and a month after anthelmintic therapy. Echinococcal-specific DNA was found by PCR in the cyst contents and the blood samples of the patient obtained during the surgical intervention and a month after the anti-relapse treatment. The molecular genetic research method can serve as a tool in the cyst echinococcosis diagnosis as an additional method to the histological one. Contamination of blood and other cavities and organs during the intervention is of great importance for determining a further management tactics of echinococcosis patients.

Keywords: *Echinococcus* spp., *Echinococcus granulosus*, *Echinococcus multilocularis*, PCR

¹ Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology (119, Gazetnyy alley, Rostov-on-Don, 344000, Russia)

² Federal State Budgetary Institution of Science "Federal Research Center the Southern Scientific Center of the Russian Academy of Sciences" (41, Chekhova Ave., Rostov-on-Don, 344006, Russia)

³ State Healthcare Institution "Regional Clinical Hospital No. 2" (33, 1-oi Konnoy Armii st., Rostov-on-Don, 344065, Russia)

Введение. Кистозный эхинококкоз (КЭ) – зоонозный гельминтоз, широко распространен во всем мире [2]. Характеризуется длительным бессимптомным периодом и поздней диагностикой, что приводит к увеличению объема поражения, усложнению хирургического вмешательства и увеличению рисков развития послеоперационных осложнений и рецидивов. В настоящее время основным лабораторным методом оценки эффективности хирургического и противорецидивного лечения является иммуноферментный анализ (ИФА) с целью выявления IgG к антигенам однокамерного эхинококка. Во время роста кисты титры антител могут сильно варьировать, давать перекрестные реакции, в результате чего оценка антител к эхинококкам сама по себе не подтверждает клинический диагноз. Окончательный диагноз КЭ устанавливается патоморфологическим методом, направленном на обнаружение протосколексов. При их небольшом количестве в крупных кистах, содержащих большое количество гидатидозной жидкости, высоки риски гиподиагностики эхинококкоза. Молекулярно-генетический метод исследования, как прямой, позволяет выявлять незначительное количество ДНК гельминтов в любых тканях гидатиды, поможет снизить ошибки диагностики и стать дополнительным инструментом.

Цель исследования: оценить целесообразность метода ПЦР для исследования крови больных с интраоперационными осложнениями (анафилактический шок).

Материалы и методы. Материалом для исследования послужили биологический материал из гидатидозной кисты, полученный в результате ее пунктирования в условиях ГБУ РО Областная клиническая больница № 2, а также парные пробы крови с ЭДТА от больной Е. 35 лет. Диагноз: множественный эхинококкоз печени и правого легкого. В июле 2023 года пациентке была выполнена торакотомия и удаление 2 кист правого легкого. В связи с наличием множественных кист печени (5 гидатид диаметром от 30 до 55 мм) (рис. 1), больной было рекомендовано оперативное вмешательство методом PAIR. В процессе пунктирования крупной (55 мм) кисты у больной развился анафилактический шок, в связи с чем полноценная обработка кисты гермицидным препаратом была отсрочена до стабилизации состояния больной. В общем анализе крови, полученном в течение 12 часов после хирургического вмешательства (проба № 1) отмечена эозинофилия до 38%. С учетом отсутствия абсолютных противопоказаний к антигельминтной терапии больной был незамедлительно назначен

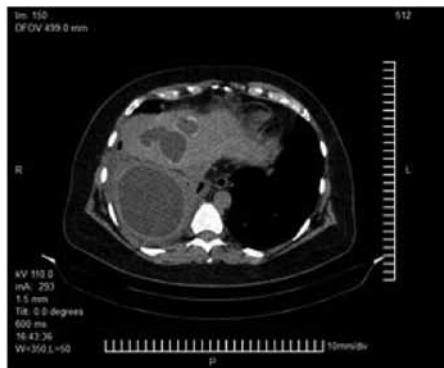


Рис. 1. Множественные кисты печени (КТ)

альбендазол 800 мг/сутки в 2 приема с интервалом 12 часов. После стабилизации состояния больная была выписана для дальнейшего амбулаторного лечения. Противорецидивную терапию переносила удовлетворительно без побочных эффектов. При контрольном обследовании крови через 1 месяц у больной сохранялась эозинофилия до 24% (проба № 2).

Для оценки рисков развития рецидивов исследованы 2 пробы крови: проба № 1 получена в течение 12 часов после PAIR, проба № 2 – через месяц на фоне антигельминтной терапии.

Для ПЦР использовали 3 пары разработанных нами специфических праймеров к *Echinococcus* spp., *E. granulosus*, *E. multilocularis*, имеющие следующий нуклеотидный состав:

5'-AAGACGAAAGACCCTAGGA-3' (F_e2) и

5'-TCAACATCGAGGTGGCAAAC-3' (R_e2),

специфичные для *Echinococcus* spp.;

5'-TAGTGAGTATTATGAATTTGTCT-3' (F_g2) и

5'-CGCGAAATAACACCAACCCT-3' (R_g2),

для *Echinococcus granulosus*;

5'-AGACATTATTTGGTGGTTC-3' (F_m1) и

5'-TGTACACAAATAATCACCA-3' (R_m1),

для *Echinococcus multilocularis*.

Для выделения ДНК использовали коммерческий набор М-Сорб-кровь (СИНТОЛ) с добавлением протеиназы К (концентрация 10 мг/мл, 7 мкл на пробу) и ДТТ (1М, 5 мкл на пробу).

Приготовление ПЦР смеси для проведения реакции осуществляли с использованием набора реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии EVAGreen (СИНТОЛ).

Аmplификацию проводили с помощью прибора ДТ-96 (ДНК-Технология). Скорость нагревания/охлаждения (Ramp) выбиралась по умолчанию [1].

Результаты исследований. В герминативной жидкости, полученной в результате PAIR, обнаружены протосколексы *E. granulosus* (20-30 и более в 0,1 мл). При исследовании методом ПЦР содержимого кисты получены положительные результаты с праймерами к *Echinococcus* spp. (на 15 цикле), с праймерами к *E. granulosus* (на 16 цикле). Результат ПЦР с праймерами к *E. multilocularis* – отрицательный. Исследование пробы крови № 1 больной дало положительный результат с праймерами к *Echinococcus* spp. (на 30 цикле) и к *E. granulosus* (на 31 цикле). При исследовании пробы крови № 2 больной положительный результат ПЦР зарегистрирован только с праймерами к *Echinococcus* spp. (на 35 цикле). В течение месяца в периферической крови сохранялась эозинофилия от 10 до 24%. Коэффициенты позитивности специфичных IgG к *E. granulosus* до операции составляли 5,5, через 1,5 месяца после оперативного вмешательства на фоне антигельминтной терапии – 3,3.

Заключение. Контаминация крови и других полостей и органов при оперативном вмешательстве имеет важное значение для определения тактики дальнейшего ведения больных эхинококкозами. ИФА для выявления IgG к однокамерному эхинококкозу достоверен не ранее чем через месяц после хирургического лечения. ПЦР позволяет выявить диссеминацию антигенов сразу после хирургического вмешательства. На данном примере ДНК возбудителя КЭ обнаруживался как сразу после операции, так и в течение месяца.

Список источников

1. Патент № 2807745 С1, 21.11.2023. Заявка № 2023108803 от 07.04.2023 Способ выявления ДНК эхинококкозов *Echinococcus granulosus* и *Echinococcus multilocularis* методом полимеразной цепной реакции / В. О. Теличева, С. А. Нагорный, Л. А. Ермакова [и др.]: заявитель Федеральное бюджетное учреждение науки «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии». 29 с.
2. Wen H., Vuitton L., Tuxun T., Li J., Vuitton D. A., Zhang W., McManus D. P. Echinococcosis: advances in the 21st century // *Clinical microbiology reviews*. 2019; 32(2): 10-1128.

References

1. Patent 2807745 C1 dated 21/11/2023. Application 2023108803 dated 07/04/2023, DNA detection of echinococcosis caused by *Echinococcus granulosus* and *Echinococcus multilocularis* by polymerase chain reaction / V. O. Telicheva, S. A. Nagorny, L. A. Ermakova [et al]: Applicant, the Federal Budgetary Institution of Science "Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology". 29 p. (In Russ.)
2. Wen H., Vuitton L., Tuxun T., Li J., Vuitton D. A., Zhang W., McManus D. P. Echinococcosis: advances in the 21st century. *Clinical microbiology reviews*. 2019; 32(2): 10-1128.