

ЛАБОРАТОРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БЛАСТОЦИСТНОЙ ИНВАЗИИ У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКИМИ ВИРУСНЫМИ ГЕПАТИТАМИ

А.С. Сигидаев¹, В.С. Сукачев¹, М. В. Куртуков¹, К.В. Жданов¹,
С.С. Козлов¹, К.В. Козлов¹, А.В. Ласкин¹, Е.А. Тарасова², М.А. Суворова²

¹ Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

² НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург

Laboratory characteristics of blastocystis invasion in patients with chronic viral hepatitis

A.S. Sigidaev¹, V.S. Sukachev¹, M.V. Kurtukov¹, K.V. Zhdanov¹, S.S. Kozlov¹,
K.V. Kozlov¹, A.V. Laskin¹, E.A. Tarasova², M.A. Suvorova²

¹ Military Medical Academy named after S.M. Kirov, Saint-Petersburg

² Institute of Experimental Medicine of the NorthWest Branch of the Russian Academy of Medical Sciences (IEM NWB RAMS), Saint-Petersburg

Резюме. На основании результатов обследования 1322 пациентов установлено, что у больных хроническим вирусным гепатитом (ХВГ) бластоцисты обнаруживаются чаще, чем в группе лиц без сопутствующей патологии со стороны гепатобилиарной системы (28,8% против 5,5%, соответственно). У практически здоровых лиц бластоцисты чаще выявлялись в летний период, с пиком в июле и августе, в то время как у больных с ХВГ *Blastocystis* наиболее часто обнаруживались в зимнее время. Высокая частота встречаемости *Blastocystis sp.* у пациентов ХВГ позволяет предполагать, что патология гепатобилиарной системы способствует формированию благоприятных условий в желудочно-кишечном тракте для колонизации его бластоцистами. Молекулярно-биологические методы исследования позволили установить, что антропонозный субтип бластоцист встречался в этой группе больных в 5,3 раза реже, чем у лиц без сопутствующей патологии печени.

Ключевые слова: лабораторная диагностика, хронические вирусные гепатиты, бластоцисты, *Blastocystis hominis*.

Введение

В последние годы в России отмечается напряженная эпидемиологическая обстановка по паразитарным болезням, в стране ежегодно официально регистрируется более 1,3 миллионов больных различными паразитозами. Однако уровень заболеваемости паразитарными инвазиями и их экономическое значение для здравоохранения и страны в целом остаются по ряду причин недооцененными. Среди причин сохранения такой ситуации — сложности специфической диагностики, отсутствие четкой системы учета заболеваемости, недостаточные знания врачей, а также широкое распространение как среди врачей, так и население

Abstract. Based on the survey results in 1322 patients found that patients with chronic viral hepatitis (CVH) blastocysts are found more often than in the group of individuals without concomitant pathology of the hepatic-biliary system (28.8% vs. 5.5%, respectively). In healthy individuals the blastocyst revealed more often in the summer, peaking in July and August, while in patients with CVH *Blastocystis* most frequently observed in winter. The high incidence of *Blastocystis sp.* CVH patients suggests that the pathology of the hepatic-biliary system fosters a supportive environment in the gastrointestinal tract for the colonization of its blastocyst. Molecular biological methods of investigation revealed that the subtype antropozny blastocysts met in this population, 5.3 times less likely than those without concomitant liver disease.

Keywords: laboratory diagnostics, chronic virus hepatitis, *Blastocystis*, *Blastocystis hominis*.

ния заблуждений как в области диагностики, так и лечения паразитозов. Так, Главный государственный санитарный врач РФ Г.Г. Онищенко в своем докладе на съезде эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (2004) отметил, что данные официальной статистики о паразитарной заболеваемости занижены, а истинный уровень заболеваемости в стране может превышать 20 миллионов случаев в год. При этом кишечные протозоозы в общей структуре заболеваемости занимают одну из лидирующих позиций.

Исчезновение на территории России таких облигатных патогенов, как, например, возбудители малярии, способствовало формированию ложного

представления у врачей о возможности «победы» над инфекционными и паразитарными болезнями. Вместе с тем, неуклонная тенденция к увеличению числа пациентов с первичными и вторичными иммунодефицитами, все большее число путешественников в тропические и субтропические страны способствует как появлению неизвестных ранее в нашем регионе заболеваний, так и увеличению числа инвазий, вызванных условно-патогенными агентами. Среди последних наиболее широкое распространение имеет *Blastocystis hominis*. Согласно последней классификации микроорганизмов это простейшее относится к царству *Stramenopiles* (син. *Chromista*, *Heterokonta*), подцарство *Chromobiota*, подтипу *Opalinata*, классу *Blastocystea*, отряду *Blastocystida*, семейству *Blastocystidae*, роду *Blastocystis*.

Рост интереса ученых и практических паразитологов к этому простейшему объясняется его чрезвычайно широким распространением в мире. Он обнаруживается у 30–50% жителей развивающихся стран и у 1,5–10% развитых [1, 7, 8, 11, 13], кроме того, бластоцисты часто присутствуют у больных гастроэнтерологическими заболеваниями, аллергиями и др. [2, 3, 6, 7, 9, 10, 11, 12]. Так, например, по данным Horiki и соавторов (1999), при обследовании практически здорового населения Токио (Япония) бластоцисты обнаруживались в 7,4% случаев [4], а при аналогичных исследованиях в Перми, проведенных Н.М. Коза и соавторами в 1997–2001 гг., бластоцистная инвазия выявлена в 13,1% случаев [14]. В Омске по результатам однократных обследований населения в 1999–2001 гг. частота обнаружения *Blastocystis hominis* у здоровых составляла от 0,9 до 2,3% [15].

Однако в клинической практике лаборанты часто не регистрируют наличие бластоцист в исследуемом материале. Это объясняется, с одной стороны, тем, что патогенная природа простейшего остается спорной, а, следовательно, регистрация результатов не является строго обязательной, и, с другой – слабым знанием лаборантами этого объекта. Дело в том, что регистрация *B. hominis* при копроскопических исследованиях основана на обнаружении только известных (вакуолярных) морфологических форм, характеризующихся наличием крупной центральной вакуоли, оттесняющей цитоплазму с остальными органеллами к периферии. К настоящему времени в научной литературе описаны шесть форм паразита, о существовании которых не осведомлено подавляющее большинство медицинских работников.

Одним из методов объективизации наличия бластоцист в исследуемом материале могли бы выступать методы молекулярно-генетической диагностики. Так, например, метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволяет определить на-

личие бластоцист в исследуемом материале даже при низкой интенсивности инвазии. Однако и этот высокотехнологичный метод не всегда оказывается применим на практике. На сегодняшний день не вызывает сомнений, что *Blastocystis hominis* является сборным видом и состоит из ряда так называемых субтипов (*subtype*), которые различаются на генетическом уровне. Молекулярно-биологические исследования показали, что виды *Blastocystis*, выделяемые от людей и животных, могут быть разделены на 10 и более субтипов, в связи с чем были предложены изменения в номенклатуре вида, согласно которым используется название *Blastocystis species subtype n.*, где *n* – число, указывающее субтип простейшего. Для всех субтипов человек может являться потенциальным хозяином, однако все они являются зоонозными, за исключением *Blastocystis species subtype 3* (собственно *Blastocystis hominis*). Существует множество публикаций, свидетельствующих о том, что 3 субтип является специфическим паразитом человека [1, 5, 7, 8, 13], также известно, что он самый распространенный в популяции людей всего земного шара. Вместе с тем, этот субтип выявляется также и у других представителей млекопитающих, что свидетельствует, по мнению ряда исследователей, о его зоонозной природе происхождения.

Выявленное генетическое внутривидовое разнообразие бластоцист, а также наличие у них сложного цикла развития, который включает существование различных морфологических форм, служит основой появления частых лабораторно-диагностических ошибок, в том числе получению ложноотрицательных результатов исследований.

Бластоцисты оказывают существенное влияние на формирование микробиоценоза биотопа обитания. Нарушая баланс микроорганизмов, данные простейшие способствуют созданию благоприятных условий для развития патологических процессов. Показано, что нарушение биоценологических взаимоотношений между патогенными бактериями и нормальной кишечной микрофлорой является одним из важнейших факторов, влияющих на развитие многих заболеваний, особенно, имеющих хроническое течение. Диарея, боли в животе, потеря аппетита, тошнота, метеоризм, рвота, субфебрильное повышение температуры – все эти симптомы часто обнаруживаются у пациентов с бластоцистной инвазией. Практически при всех изменениях в организме в патологический процесс вовлекается печень. Нарушения ее функций при самых разнообразных патологических состояниях невольно затрагивают большой круг обменных, гормональных и гомеостатических процессов. Однако влияние функционального состояния печени на развитие бластоцистной инвазии остается неизученным, также окончательно не выяс-

нена роль бластоцист в формировании патогенетических механизмов, влияющих на течение заболеваний пищеварительной системы, в том числе при поражении печени. В этой связи выявление у больных с заболеваниями печени сопутствующей протозойной инвазии в целях проведения адекватной терапии, является одной из актуальных задач инфектологии.

Цель исследования — обследование пациентов с хроническими вирусными гепатитами (ХВГ) для выявления у них сопутствующей бластоцистной инвазии, изучение эффективности различных методов диагностики этого протозооза и генотипирование изолятов для определения частоты встречаемости антропонозного субтипа бластоцист.

Материалы и методы

В период с 2009 по 2011 г. на базе клиники инфекционных болезней ВМедА им. С.М. Кирова, паразитологической лаборатории при кафедре инфекционных болезней ВМедА им. С.М. Кирова и научно-исследовательской лаборатории «Диагностика» г. Санкт-Петербург проведена серия исследований по изучению частоты обнаружения бластоцист в популяции здоровых лиц, различных группах больных, поступающих в инфекционный стационар, а также сопоставлению эффективности традиционных методов диагностики инвазии и молекулярно-генетических методов.

Нами были обследованы 1332 человека, находившихся на стационарном и амбулаторном лечении в различных лечебных учреждениях города Санкт-Петербурга. В дальнейшем исследование были включены 323 больных, прошедших комплексное клиническое, биохимическое, вирусологическое и морфологическое обследования по программе диагностики и мониторинга при хроническом вирусном гепатите (ХВГ). Для обнаружения простейших, в том числе бластоцистов, были использованы как методы традиционной паразитологической диагностики (микроскопия мазков кала), так и молекулярно-биологические методы (ПЦР).

Материал для исследования (фекалии) доставлялся в паразитологическую лабораторию не позднее двух часов после дефекации. Микроскопия мазков кала, окрашенных раствором Люголя, проводилась с соблюдением всех требований к приготовлению препарата (МУК 4.2.735-99), исследования мазков проводились на микроскопе «Leica» при увеличении $\times 400$. Для дальнейшего анализа методом ПЦР пробы кала хранились в холодильнике при температуре $+4...+6^{\circ}\text{C}$ не более суток. Для более длительного хранения материал замораживался и хранился при -20°C . ДНК бластоцист для ПЦР-анализа выделяли с помощью наборов реагентов «ДНК-экспресс» фирмы «Литех». Детек-

цию генов проводили в соответствии с методикой, рекомендованной фирмой-производителем.

В наших исследованиях применялись две пары специфических праймеров. Первая пара — на *Blastocystis hominis* (*Blastocystis species subtype 3*), вторая — на род *Blastocystis*. Последовательности праймеров указаны в табл. 1.

Таблица 1

Тест-системы для анализа методом ПЦР

Название	Последовательность 5' - 3'	
Blastocystis elongation factor 1-alpha gene	Bh_F	agaaccccgatatcgtaagaa
	Bh_R	aagtcgagtgatttcgggagag
Blastocystis 18 s ribosomal RNA gene	B18S_F	accccttcagatccagt
	B18S_R	ttgcttccatgaacaacca

Результаты и обсуждение

В результате проведенных паразитологических исследований было установлено, что у 93 больных ХВГ (28,8%) выявлена бластоцистная инвазия. Наиболее высокие показатели инвазированности данными простейшими регистрировались у пациентов с хроническими гепатитами на стадии цирроза печени (83,8%). При этом обследование лиц без ХВГ, но с другими заболеваниями желудочно-кишечного тракта (острые кишечные инфекции) показало, что экстенсивность инвазии у них составляет 5,5%. Характерным явился тот факт, что в большинстве случаев (91,5%) бластоцисты выявлялись в ассоциации с избыточным содержанием дрожжеподобных грибов. Существенных различий в частоте обнаружения бластоцист у мужчин и женщин обнаружено не было.

При микроскопии мазков кала обнаруживались клетки размером от 10 до 50 мкм, в 65,5% случаев клетки относились к вакуолярным морфологическим формам, а гранулярная форма обнаружена всего в 19,8% случаев. Одновременное выявление вакуолярных и гранулярных форм составило 14,7%. Количество клеток варьировало от 1 в 5 — 10 полях зрения до нескольких десятков в одном поле зрения. Описываемые в научной литературе амёбовидные и цистные формы нами не были обнаружены ни в одном случае.

При рутинных методах паразитологической диагностики в испражнениях, как правило, обнаруживаются вакуолярные формы бластоцист. При отсроченном исследовании испражнений, когда время от дефекации до момента проведения исследования проходит 4 часа и более эти формы становятся мало узнаваемыми, а, следовательно, при несоблюдении сроков проведения исследования и неправильном хранении проб возрастает число ложноотрицательных результатов.

Годовая динамика выявления бластоцист в испражнениях людей имела некоторые особенности. Так, у пациентов без сопутствующей патологии со стороны печени бластоцисты чаще выявлялись в летний период, с пиком в июле и августе. По нашему мнению, это связано с тем, что на летний период приходится основная пора отпусков, усиливаются миграционные процессы, увеличивается употребление фруктов и овощей, а также контакт с почвой (работы на садовых участках и огородах). У больных с ХВГ *Blastocystis* наиболее часто обнаруживались в зимнее время (рис. 1). Причину этого феномена сложно объяснить. Вероятно, это связано со снижением общего иммунитета на фоне основного заболевания, а также с разнообразием субтипов бластоцист, которые обитают в кишечнике больных с ХВГ.

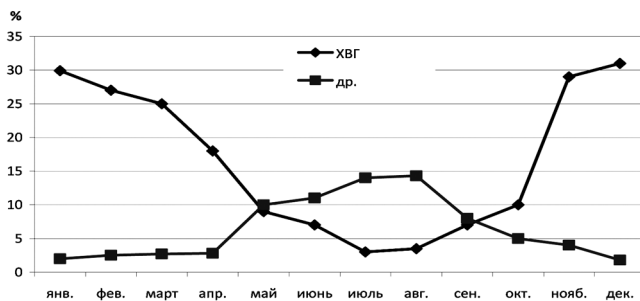


Рис. 1. Частота обнаружения *Blastocystis* spp у больных ХВГ и с прочими заболеваниями по месяцам

Результаты молекулярно-генетических исследований, проведенные методом полимеразной цепной реакции с использованием традиционной тест-системы *Blastocystis* elongation factor 1-alpha gene, не совпали с результатами традиционной микроскопической диагностики. Среди больных ХВГ (323 чел.), по результатам ПЦР, экстенсивность инвазии бластоцистами составила всего 7% (23 чел.). При этом из 93 образцов, в которых микроскопически обнаруживались бластоцисты, результаты ПЦР оказались позитивными лишь в 15% случаев (14 проб).

Повторное исследование этого же материала методом ПЦР с использованием родоспецифических праймеров (*Blastocystis* 18 s ribosomal RNA gene) позволило идентифицировать нуклеотидные последовательности генома рода *Blastocystis* в 158 пробах, что на 20,2% превысило результаты микроскопической диагностики. Это можно объяснить высокой чувствительностью метода, позволяющего идентифицировать геном бластоцист даже при низком уровне инвазии, когда микроскопически идентифицировать паразита не представляется возможным ввиду его малочисленности.

Таким образом, проведенные паразитологические и молекулярно-биологические исследования

позволили установить, что у больных ХВГ антропонозный субтип бластоцист (*Blastocystis species subtype 3*) встречался относительно редко, только в 15% случаев. В подавляющем большинстве в кишечнике этих больных обитали бластоцисты других субтипов.

Среди группы людей без патологии печени в 8,2% случаев исследования методом ПЦР давали положительный результат. При этом в 79,5% ПЦР позитивными были результаты с использованием тест-системы на *Blastocystis species subtype 3* (табл. 2).

Таблица 2

Результаты обследования пациентов паразитологическими и молекулярно-биологическими методами

Группы больных	Методы диагностики		
	Микроскопия	ПЦР детекция рода <i>Blastocystis</i>	ПЦР генотипирование (определение <i>Blastocystis species subtype 3</i>)
ХВГ	323/93 (28,8%)	93/91 (97,8%)	93/14 (15%)
С прочими заболеваниями	1009/56 (5,5%)	1009/83 (8,2%)	83/66 (79,5%)

Вместе с тем, следует отметить, что чувствительность метода ПЦР при использовании родоспецифических праймеров оказалась равной только 97,8%, поскольку из 93 заведомо положительных проб позитивный результат был получен только в 91 пробе. Такой результат можно объяснить либо техническими ошибками в проведении теста, либо с наличием генетического полиморфизма в популяции бластоцист.

Выводы

Проведенные нами исследования показали, что у больных ХВГ бластоцисты обнаруживаются чаще, чем в группе лиц без сопутствующей патологии со стороны гепатобилиарной системы (28,8% против 5,5%, соответственно), при этом имелись особенности в сезонной частоте их обнаружения. Так, у больных ХВГ бластоцисты чаще выявлялись в зимние месяцы года, а у пациентов без сопутствующей патологии со стороны печени — в летний период.

Высокая частота встречаемости *Blastocystis sp.* у пациентов ХВГ позволяет предполагать, что патология гепатобилиарной системы способствует формированию благоприятных условий в желудочно-кишечном тракте для колонизации его бластоцистами. Молекулярно-биологические методы исследования позволили установить, что антропонозный субтип бластоцист встречался в

этой группе больных в 5,3 раза реже, чем у лиц без сопутствующей патологии печени. Отдельные исследователи считают, что разные субтипы бластоцист способны оказывать различное действие на организм хозяина [7]. Полученные нами данные можно рассматривать в качестве подтверждения этого предположения.

Также следует отметить, что микроскопическое исследование фекалий является адекватным и высокоинформативным методом для выявления бластоцистной инвазии, однако определение субтипов *Blastocystis sp.* возможно только с помощью ПЦР.

Литература

1. Abe, N. Molecular and phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from various hosts / N. Abe // *Vet Parasitol.* — 2004 Mar 25. № 120(3). — P. 235–242.
2. Dođruman A. The role of protozoan parasites in etiology of urticarial / A. Dođruman [et. al.] // *Turkiye Parazitoloj Derg.* — 2009. — № 33(2). — P. 136–139.
3. Hameed, D.M. Association of *Blastocystis hominis* genetic subtypes with urticarial / D.M. Hameed, O.M. Hassanin, N.M. Zuel-Fakkar // *Parasitol Res.* — 2011 Mar. — № 108(3). — P. 553–560.
4. Horiki, N. Intestinal blockage by carcinoma and *Blastocystis hominis* infection / N. Horiki [et. al.] // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* — 1999. — V. 60, № 3. — P. 400–402.
5. Iguchi, A. Infectivity of different genotypes of human *Blastocystis hominis* isolates in chickens and rats / A. Iguchi [et. al.] // *Parasitol. Int.* — 2007 Jun. — № 56(2). — P. 107–112.
6. Jones, M.S. Association of *Blastocystis* subtype 3 and 1 with patients from an Oregon community presenting with chronic gastrointestinal illness / M.S. Jones [et al.] // *Parasitol. Res.* — 2009 Jan. — № 104(2). — P. 341–345.
7. Kevin, S.W. New Insights on Classification, Identification, and Clinical Relevance of *Blastocystis* spp. / S.W. Kevin [et.al.] // *Clinical Microbiology Reviews.* — Oct. 2008. — V. 21, № 4. — P. 639–665.
8. Meloni, D. Molecular subtyping of *Blastocystis sp.* isolates from symptomatic patients in Italy / D. Meloni [et. al.] // *Parasitol. Res.* — 2011. — Feb 22.
9. Surangsriat, S. Assessment of the association between *Blastocystis* infection and irritable bowel syndrome / S. Surangsriat [et. al.] // *J. Med. Assoc. Thai.* — 2010 Nov. — 93. Suppl 6. — P. 119–124.
10. Trabelsi, S. Clinical and epidemiological characteristics of *blastocystis hominis* / S. Trabelsi, I.B. Ali, S. Khaled // *Tunis Med.* — 2010 Mar. — № 88(3). P. 190–192.
11. Vogelberg, C. *Blastocystis sp.* subtype 2 detection during recurrence of gastrointestinal and urticarial symptoms / C. Vogelberg [et. al.] // *Parasitol. Int.* — 2010. — Sep; 59(3). P. 469–471.
12. Yakoob, J. Irritable bowel syndrome: is it associated with genotypes of *Blastocystis hominis* / J. Yakoob [et. al.] // *Parasitol. Res.* — 2010 Apr. — № 106(5). — P. 1033–1038.
13. Yoshikawa, H. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from children and rhesus monkeys in Kathmandu, Nepal / H. Yoshikawa [et. al.] // *Vet. Parasitol.* — 2009 Mar 23. — № 160(3–4). — P. 295–300.
14. Коза, Н.М. Распространение кишечных протозоозов среди населения крупного города / Н.М. Коза, В.И. Сергеев, Л.Я. Горбань // *Материалы VIII Всерос. съезда эпидемиологов, микробиологов и паразитологов.* — М.: ООО «Росинекс», 2002. — Т. 1. — С. 339–340.
15. Старостина, О.Ю. Распространенность паразитических инвазий у городских жителей / О.Ю. Старостина, С.П. Запарий, Л.М. Толмачева // *Материалы VIII Всерос. съезда эпидемиологов, микробиологов и паразитологов.* — М.: ООО «Росинекс», 2002. — Т. 1. — С. 403–404.

Авторский коллектив:

Жданов Константин Валерьевич — начальник кафедры инфекционных болезней Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, д.м.н. профессор, тел. 8(812)542-92-14, e-mail: ZhdanovKV@rambler.ru;

Козлов Сергей Сергеевич — профессор кафедры инфекционных болезней Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, д.м.н. тел. 8(812)292-33-57, e-mail: infectology@mail.ru;

Сигидаев Алексей Сергеевич — адъюнкт кафедры инфекционных болезней Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, тел. 8(812)292-33-57, e-mail: sigiday@yandex.ru;

Сукачев Виталий Сергеевич — адъюнкт кафедры инфекционных болезней Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, тел. 8(812)292-33-57, e-mail: dr.sukachev@gmail.com;

Куртуков Максим Викторович — врач клиники инфекционных болезней Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, тел. 8(812)292-33-57, e-mail: maxkurt84@mail.ru;

Тарасова Елена Анатольевна — научный сотрудник НИИ Экспериментальной Медицины СЗО РАМН, тел. 8(812)2341995, e-mail: tarasovahellen@mail.ru;

Суворова Мария Александровна — научный сотрудник НИИ Экспериментальной Медицины СЗО РАМН, тел. 8(812)2349480, e-mail: masha.suvorova@gmail.com;

Ласкин Александр Викторович — старший преподаватель кафедры инфекционных болезней Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, к.м.н. тел. 8(812)292-33-57, e-mail: lar_vma@mail.ru;

Козлов Константин Вадимович — преподаватель кафедры инфекционных болезней Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, к.м.н. тел. 8(812)292-33-57, e-mail: kosttiak@mail.ru.