

М. А. Андрейчин, Т. І. Юзьків, М. Т. Гук, М. І. Шкільна, О. Л. Івахів, І. С. Ішук, Н. Г. Завіднюк

ВИЯВЛЕННЯ ЛАЙМ-БОРЕЛІОЗУ, БАРТОНЕЛЬОЗУ ТА ЕПШТЕЙНА-БАРР ВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ У ПАЦІЄНТІВ ІЗ ЛІМФАДЕНОПАТІЄЮ, ЖИТЕЛІВ ТЕРНОПІЛЬЩИНИ

Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського

Мета роботи – обстежити жителів Тернопільської області з лімфаденопатією за допомогою серологічних і молекулярно-генетичних методів на наявність у них Лайм-бореліозу, бартонельозу, EBV-інфекції та їх поєднань.

Пацієнти і методи. У Центрі із вивчення Лайм-бореліозу та інших інфекцій, що передаються кліщами, при Тернопільському національному медичному університеті ім. І. Я. Горбачевського МОЗ України обстежено 36 пацієнтів віком від 19 до 76 років, в яких відзначали лімфаденопатію (ЛАП). Чоловіків було 9 (25,0 %), жінок – 27 (75,0 %). У місті проживали 26 (72,2 %) осіб, у сільській місцевості – 10 (27,8 %).

Для виявлення IgM і/чи IgG до *B. burgdorferi* s. l. у сироватці крові використали двохетапну схему (ІФА та імуноблот), застосували тест-системи компанії Euroimmun AG (Німеччина). Отримані результати аналізували відповідно до рекомендацій виробника тест-систем. Антитіла класу G до *Bartonella henselae* та *Bartonella quintana* в сироватці крові пацієнтів визначали за допомогою методу мультиплексної непрямой імунофлуоресценції, застосували тест-системи «Mosaic for *Bartonella henselae/Bartonella quintana* (IgG)», компанії Euroimmun AG (Німеччина), технологія БЮЧИП, які містили мічені флуоресцеїном антигени зазначених видів бартонел.

Результати визначення специфічних антитіл до *B. henselae* і *B. quintana* та зазначених антигенів EBV-інфекції оцінювали в полі зору флуоресцентного мікроскопа (Olympus IX70, ок $\times 10$, об $\times 20;40$) за яскраво-зеленим світінням імунного комплексу антиген-антитіло, міченого флуоресцеїном.

Для діагностики EBV-інфекції використали мультиплексну реакцію непрямой імунофлуоресценції (РНІФ) (технологія БЮЧИП). Застосували тест-систему «BIOCHIP Sequence EBV (with avidity determination)» (EUROIMMUN, Німеччина), яка містить капсидний антиген і його білки gp125 і p19, ядерний та ранній антигени EBV.

Для встановлення активної чи латентної фази хронічної EBV-інфекції використали ПЛР у режимі реального часу, за допомогою якої в плазмі крові та слині обстежених пацієнтів визначали ДНК EBV. Активну фазу хронічної EBV-інфекції діагностували за наявністю ДНК EBV у крові та слині (в обох чи одному зразку; діапазон визначення – 10^3 - 10^7 копій/мл). За відсутності ДНК вірусу у крові чи слині встановлювали латентну фазу хронічної EBV-інфекції.

Результати. Укусів кліщів зазнали 50,0 % хворих із лімфаденопатією, здебільшого в нижні кінцівки, суттєво частіше під час перебування в лісі та на садово-городніх ділянках, $p < 0,05$.

Використання почергово ІФА та імуноблоту дозволило діагностувати Лайм-бореліоз у 55,6 % пацієнтів із лімфаденопатією. Специфічні антитіла IgG лише до *B. henselae* діагностовано в сироватці крові 13,9 % пацієнтів із лімфаденопатією, поєднаною з Лайм-бореліозом. Метод мультиплексної РНІФ (технологія БЮЧИП) дав змогу діагностувати хронічну EBV-інфекцію в усіх пацієнтів із лімфаденопатією. За допомогою полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі активну фазу хронічної EBV-інфекції встановлено у 52,8 % пацієнтів, латентну фазу – у 47,2 % хворих. У 72,2 % хворих із лімфаденопатією діагностовано Лайм-бореліоз, бартонельоз, спричинений *B. henselae*, та активну фазу хронічної EBV-інфекції як окремо, так і в різних поєднаннях.

Висновок. Пацієнтів із лімфаденопатією доцільно обстежувати щодо можливої одночасної наявності у них Лайм-бореліозу, бартонельозу та хронічної EBV-інфекції. Метод РНІФ (технологія БЮЧИП) із визначенням восьми специфічних антитіл одночасно для діагностики EBV-інфекції в пацієнтів із лімфаденопатією, мешканців Тернопільської області, застосований вперше і продемонстрував високу інформативність.

Ключові слова: лімфаденопатія, Лайм-бореліоз, бартонельоз, EBV-інфекція, мультиплексна непрям

імунофлуоресценція, технологія БЮЧИП, полімеразна ланцюгова реакція, імуноблот.

Лімфаденопатія (ЛАП) – симптомокомплекс, основною ознакою якого є збільшення лімфатичних вузлів із порушенням їх структури та функції [1]. Залежно від поширеності процесу розрізняють такі варіанти ЛАП: локальна – збільшення лімфовузла в одній анатомічній ділянці; регіонарна – збільшення кількох лімфовузлів в одній або двох суміжних ділянках; генералізована – збільшення лімфовузлів більше ніж у двох анатомічних ділянках, за винятком пахових; за причиною виникнення: інфекційні та неінфекційні [1].

Інфекційні захворювання, при яких відзначають ЛАП, можуть бути бактерійної етіології – хвороба котячих подряпин, бруцельоз, туляремія, венерична лімфогранульоза, спричинена хламідіями, Лайм-бореліоз (ЛБ), сифіліс, туберкульоз, лепра, у тому числі зумовлені піогенними мікробами (стафіло- і стрептококи); вірусної – Епштейна-Барр вірусна інфекція, цитомегаловірусна інфекція, ВІЛ-інфекція, кір; грибової – гістоплазмоз, кокцидіомікоз, актиномікоз, а також паразитарної – токсоплазмоз, токсокароз, ехінококоз, опісторхоз, лямбліоз, трипаносомоз, філяріоз [1-4].

ЛБ (хвороба Лайма) – найпоширеніша трансмісивна хвороба, яка спричинюється спірохетами комплексу *Borrelia burgdorferi sensu lato* (s. l.), передається кліщами і характеризується широким поліморфізмом клінічних проявів [5-7]. Водночас ЛБ часто супроводжується розвитком ЛАП [8-9]. Щороку на цю недугу хворіють понад 476 000 осіб у США [10] і більше 200 000 – в Європі [11-13]. На обґрунтоване переконання фахівців, ЛБ діагностують не завжди й іноді помилково, тому оцінка офіційної захворюваності суперечлива і, ймовірно, реальна захворюваність є значно вищою [14]. Тернопільська область є ендемічною щодо ЛБ [15]. Для своєчасної діагностики ЛБ суттєве значення має виявлення клінічної симптоматики, ретельно зібраний епідеміологічний анамнез, лабораторне підтвердження недуги бактеріоскопічним, бактеріологічним чи серологічними методами [16].

Відомо, що під час присмокування кліщ може заразити постраждалого збудниками декількох інфекцій одночасно: бореліями, анаплазмами, бабезіями, ерліхіями, бартонами та ін. [17-19]. У таких випадках клінічні прояви різних недуг можуть взаємно підсилюватися чи проявлятися одночасно, незалежно одні від інших. За даними зарубіжних дослідників, суттєво частіше серед подібних коінфекцій відзначають поєднання ЛБ з бартонельозом [20].

Бартонельоз – група інфекційних хвороб, що спричинені бартонами (факультативно внутрішньоклітин-

ними бактеріями), які для свого росту потребують геміну або продуктів розпаду еритроцитів, характеризуються розвитком гострих і хронічних форм зі значним розмаїттям клінічних проявів й можливістю ураження багатьох органів і систем [21]. Бартонельозу, спричиненому *Bartonella henselae* і *B. quintana*, також притаманний поліморфізм симптомів із розвитком ЛАП [20; 22].

Епштейна-Барр вірусна інфекція спричинюється однойменним вірусом Епштейна-Барр (англ. Epstein-Barr virus (EBV), human herpes virus 4 – вірус герпесу людини 4-го типу), який належить до родини *Herpesviridae*, підродини *Gammaherpesviridae*, є типовим представником лімфотропних вірусів приматів (*Lymphocryptovirus*). За даними низки дослідників, у різних регіонах світу серопозитивними щодо цього збудника є близько 90-95 % дорослих і від 50 до 80 % дітей [23-24]. EBV зумовлює хвороби імунної системи з розвитком синдромів лімфопролиферації та імунної недостатності, володіє опортуністичними й онкогенними властивостями [25-26]. В останнє десятиліття суттєво збільшилося число повідомлень про хронічний перебіг EBV-інфекції [27].

Хронічна EBV-інфекція може перебігати як у латентній (безсимптомній), так і в активній фазах. Оскільки хронічна активна EBV-інфекція немає патогномонічних проявів чи характерної симптоматики, суттєві складнощі виникають при діагностиці недуги, особливо встановленні її форми [28]. Натепер для серологічної діагностики EBV-інфекції зазвичай застосовують три методи: реакцію непрямой імунофлуоресценції (РНІФ), імуноферментний аналіз (ІФА) і вестерн-блот [27]. Порівняно з іншими методами РНІФ залишається класичним, високо специфічним, так званим «золотим стандартом», який дозволяє діагностувати різні фази хронічної EBV-інфекції в одному зразку сироватки крові хворого [27].

Мета – обстежити жителів Тернопільської області з лімфаденопатією за допомогою серологічних і молекулярно-генетичних методів на наявність у них ЛБ, бартонельозу, EBV-інфекції та їх поєднання.

Пацієнти і методи

У Центрі з вивчення ЛБ та інших інфекцій, що передаються кліщами, при Тернопільському національному медичному університеті ім. І. Я. Горбачевського МОЗ України обстежено 36 пацієнтів віком від 19 до 76 років, в яких виявили ЛАП. Чоловіків було 9 (25,0 %), більшість склали жінки – 27 (75,0 %). У місті проживали 26 (72, 2 %) осіб, у сільській місцевості – 10 (27,8 %).

Критеріями включення в обстеження були: клінічні ознаки ЛАП; особи віком від 19 до 76 років; проживання в ендемічному щодо ЛБ регіоні та/або укуси кліщів в анамнезі; відсутність інших маніфестних гострих інфекцій або хронічних недуг у стадії загострення; не вживали імуно-

стимулювальних препаратів протягом останніх 6 міс.; не вакцинувалися впродовж крайніх 30 днів перед відбором зразків крові; не мали професійних шкідливостей. Хворі, які не відповідали зазначеним критеріям, у дослідження не ввійшли.

Для з'ясування епідеміологічних особливостей можливого ЛБ у хворих із ЛАП використали уніфіковану анкету-опитувальник, розроблену науковцями Державної Вищої школи імені Папи Іоана-Павла II (Бяла Подляска, Польща), і адаптовану для українських пацієнтів працівниками кафедри інфекційних хвороб з епідеміологією, шкірними та венеричними хворобами ТНМУ імені І. Я. Горбачевського. Пацієнти дали відповідь на такі питання анкети: кількість і час укусів кліщів, місцевість, на якій вони їх зазнавали, локалізація присмокування цих членистоногих до поверхні тіла, спосіб видалення кліщів тощо.

Зазначені дослідження виконані в рамках комплексної науково-дослідної роботи кафедри інфекційних хвороб з епідеміологією, шкірними та венеричними хворобами ТНМУ імені І. Я. Горбачевського МОЗ України «Діагностика, лікування і профілактика кліщових інфекцій в умовах війни та вдосконалення заходів біобезпеки» (номер державної реєстрації 0123U101288).

Для серологічного підтвердження діагнозу ЛБ застосували двохетапну схему. На першому етапі в сироватках крові пацієнтів методом ІФА визначали антитіла до антигенів комплексу *B. burgdorferi* s. I. Для ідентифікації антитіл класів М і G використали тест-системи «Anti-Borrelia burgdorferi ELISA (IgM)» та «Anti-Borrelia plus VisE ELISA (IgG)», виробник Euroimmun AG (Німеччина). На другому етапі позитивні та проміжні результати, отримані методом ІФА, підтверджували методом імуного блотингу з використанням тест-систем EUROLINE *Borrelia* RN-AT, Euroimmun AG (Німеччина).

Діагноз бартофельозу встановлювали на підставі детекції сироваткових антитіл класу G до *B. henselae* і *B. quintana* за допомогою методу мультиплексної непрямой імуофлуоресценції з використанням технології БЮЧИП. Застосували тест-системи «Mosaic for *Bartonella henselae* / *Bartonella quintana* (IgG)» компанії Euroimmun AG (Німеччина). Вони містили мічені флуоресцеїном антигени зазначених бартофель. Результати оцінювали в полі зору флуоресцентного мікроскопа Olympus IX70 у світлі ртутної лампи на 100 Вт, фільтр збудження з 470–490 нм, бар'єрний фільтр із 520–560 нм, ок $\times 10$, об $\times 20$; 40. Згідно з рекомендаціями виробника тест-систем, позитивним щодо наявності IgG до *B. henselae* є результат, коли у взірці наявна грубозерниста флуоресценція міченого флуоресцеїном комплексу антиген-антитіло, до *B. quintana* – флуоресценція від дрібно- до грубозернистої.

Для діагностики EBV-інфекції застосували мультиплексну РНІФ, технологія БЮЧИП. При проведенні реакції

використали тест-систему «BIOCHIP Sequence EBV (with avidity determination)» (EUROIMMUN, Німеччина), яка дає змогу в одному зразку сироватки крові одночасно визначити специфічні антитіла класів М і G до вірусного капсидного антигену (англ. – viral capsid antigen, VCA) і його білків: gp125 (нативного антигену) і p19 (рекомбінантного білка), антитіл класу G до ядерного антигену (Epstein-Barr nuclear antigen, EBNA) і до раннього антигену (early antigen, EBV-EA).

Сироватки крові хворих досліджували в полі зору флуоресцентного мікроскопа Olympus IX70 як зазначено вище. Інтерпретацію отриманих результатів серологічних досліджень здійснювали згідно з рекомендаціями виробника тест-систем [29].

Для встановлення активної чи латентної фази хронічної EBV-інфекції використали ПЛР у режимі реального часу, за допомогою якої в плазмі крові та сліні обстежених пацієнтів визначали ДНК EBV. Активну фазу хронічної EBV-інфекції діагностували за наявності ДНК EBV – у крові та сліні (в обох чи одному зразку; діапазон визначення – 10^3 - 10^7 копій/мл). За відсутності ДНК вірусу в крові чи сліні встановлювали латентну фазу хронічної EBV-інфекції.

Результати досліджень та їх обговорення

Самостійно збільшення лімфатичних вузлів виявили 8 (22,2 %) пацієнтів із 36 осіб із ЛАП, у решти 28 (77,8 %) – ці зміни діагностували лікарі під час об'єктивного огляду чи проведення інструментальних досліджень. У подальшому лікарі скерували цих хворих у наш Центр із вивчення ЛБ та інших інфекцій, що передаються кліщами для лабораторного обстеження з метою з'ясування можливої наявності в них ЛБ, бартофельозу та хронічної EBV-інфекції.

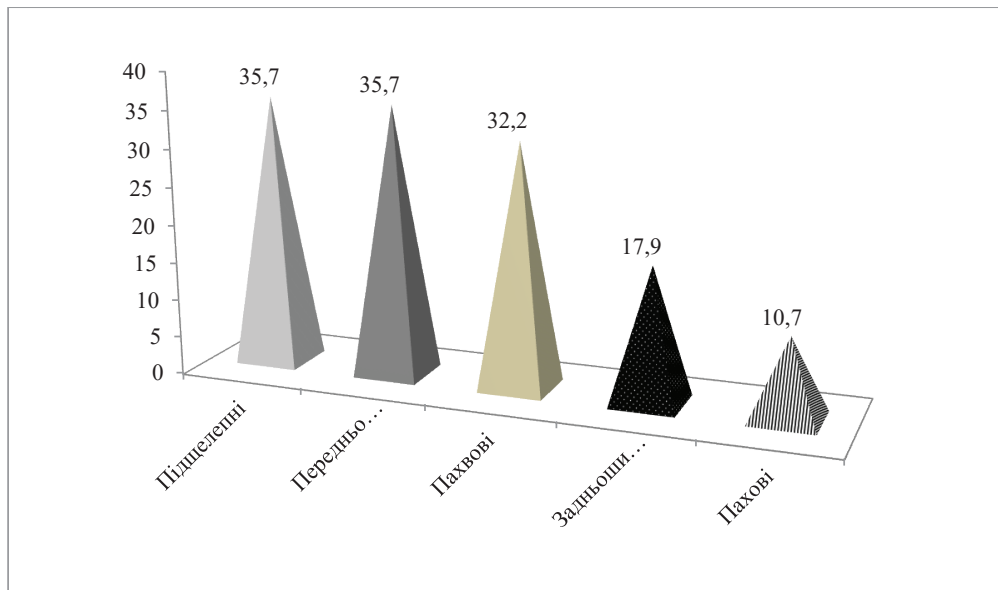
Встановлено, що половину пацієнтів скерували на обстеження неврологи (25,0 %) та онкологи (25,0 %), по 5 (17,8 %) – дерматовенерологи і ревматологи, найменше – лише по 7,2 % пацієнтів були спрямовані лікарями загальної практики – сімейної медицини та отоларингологами.

При огляді пацієнтів насамперед з'ясовували локалізацію збільшених лімфовузлів. Виявили, що у 28 (77,8 %) осіб із 36 обстежених збільшеними були регіональні лімфатичні вузли, а саме: по 10 (35,7 %) – підщелепні та передньошийні, у 9 (32,2 %) – пахові; у 5 (17,9 %) – задньошийні; у 3 (10,7 %) – пахові (мал. 1). Водночас, у 8 (22,2 %) хворих виявлено генералізовану ЛАП.

У подальшому вивчали інші скарги цих хворих. Встановлено, що більшість осіб (20; 55,6 %) турбували болі в суглобах, майже половина (17; 47,6 %) відзначали безсоння і/або хронічне недосипання та підвищення температури тіла (16; 44,5 %). Більше третини пацієнтів (13; 36,1 %) зауважили в себе зниження здатності

до виконання точних дій, а третина (12; 33,3 %) – підвищену втому/загальну слабкість. 11 (30,6 %) хворих відзначали зниження пам'яті та уваги, 10 (27,8 %) – емоційну лабільність. Водночас на болі в м'язах обстежені пацієнти скаржилися значно рідше – лише 6 (16,7 %) осіб, а на неприємні відчуття в горлі та утруднене носове дихання – ще рідше, по 4 (11,1 %) обстежених відповідно (мал. 2). Варто зазначити, що ці скарги пацієнти відзначали довше, ніж 6 міс.

Оскільки Тернопільська область ендемічна щодо ЛБ, для з'ясування епідеміологічних особливостей можливої цієї недуги в обстежених хворих застосували анкету-опитувальник. Встановлено, що укусів кліщів зазнали 18 (50,0 %) із 36 респондентів, решта 18 (50,0 %) – не пам'ятали їх, але зазначали, що скарги в них з'явилися через певний час після відвідування лісу чи міських парків, роботи на присадибних ділянках тощо.



Мал. 1. Локалізація збільшених регіонарних лімфатичних вузлів в обстежених пацієнтів із ЛАП, n=28, %.



Мал. 2. Частота скарг в обстежених пацієнтів із ЛАП, n=36, %.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Далі в осіб, котрі зазнали укусів кліщів, з'ясовували їх кількість. Про один епізод нападу кліща повідомили 6 (33,3 %) із 18 осіб, про два – 5 (27,8 %), три і більше – 7 (38,9 %) опитаних. Також дізнавалися за місцевість, на якій пацієнти зазнали нападів кліщів. Так, 8 (44,5 %) осіб вказали, що кліщі їх кусали в лісі, 7 (38,9 %) – на садово-городніх ділянках, 3 (16,6 %) – у парках.

Окрім того, з'ясовували локалізацію укусів кліщів. Варто зазначити, що осіб, які мали укуси в декілька різних місць, не було. Суттєво частіше обстежених пацієнтів кліщі кусали в нижні кінцівки – 11 (61,1 %), $p < 0,05$, по 2 (11,1 %) опитаних вказали на укуси кліщів у тулуб ззаду або голову, по 1 (5,5%) респонденту зазнали укусів кліщів у руки, тулуб спереду чи живіт.

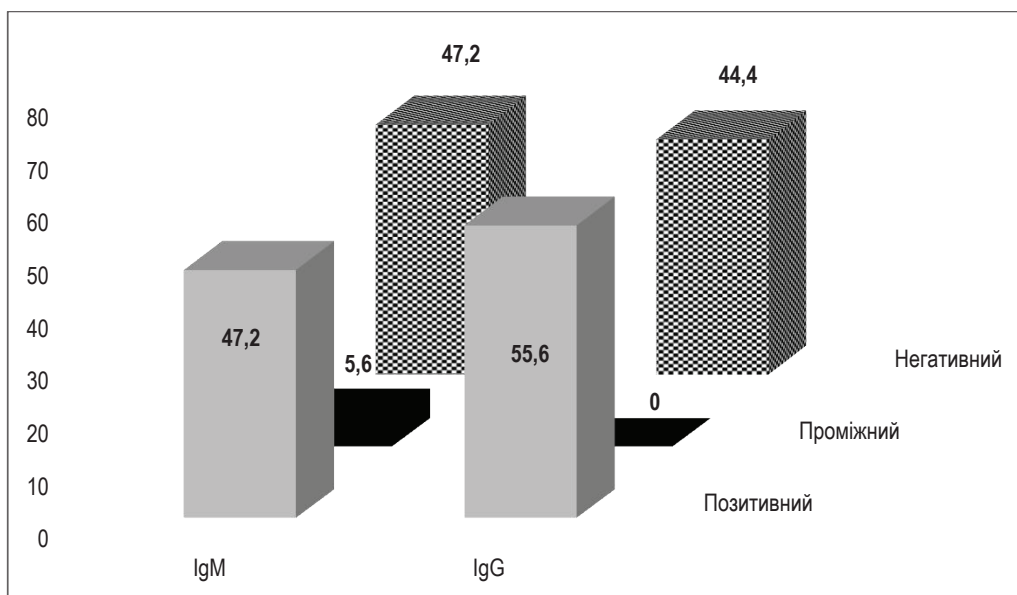
Проведення серологічної діагностики ЛБ у два етапи з використанням почергово ІФА та імуноблоту загалом дозволило виявити позитивні або проміжні результати наявності антитіл класів М і/або G до *B. burgdorferi s. l.* у сироватках крові 25 (69,4 %) пацієнтів із 36 обстежених, причому у 12 (33,3 %) – були присутні антитіла обох класів одночасно.

Сироваткові антитіла класу М до спірохет комплексу *B. burgdorferi s. l.* виявлено у 17 (47,2 %) хворих, проміжні результати отримано у 2 (5,6 %), у решти 17 (47,2 %) осіб антитіл не знайдено. Водночас у сироватках крові хворих визначали наявність специфічних антитіл класу G. Позитивні результати отримано у 20 (55,6 %) обстежених, негативні – у 16 (44,4 %); проміжних результатів щодо антитіл цього класу не було в жодного з пацієнтів (мал. 3).

При ретельному аналізі результатів серологічного дослідження з'ясовано, що в 5 пацієнтів виявлено сироваткові антитіла лише класу М до *B. burgdorferi s. l.* Варто зазначити, що у них протягом 6-тимісячного спостереження сероконверсії не відбулося – специфічні IgM не зникли, а специфічні IgG не з'явилися, що загалом можна трактувати як хибнопозитивний результат. Тому, загалом, за допомогою серологічного дослідження, проведеного у два етапи, ЛБ вдалося діагностувати у 20 (55,6 %) пацієнтів.

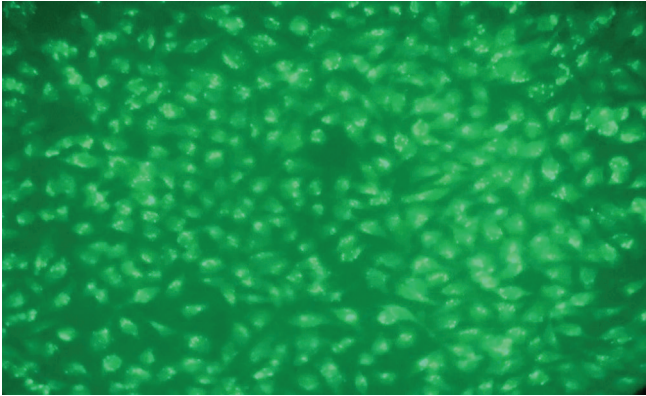
Методом мультиплексної непрямой імунофлуоресценції з використанням технології БЮЧИП у сироватках крові обстежених хворих виявляли антитіла класу G до *B. henselae* і *B. quintana* (мал. 4). Необхідно зазначити, що IgG знайдено лише до *B. henselae* у 5 (13,9 %) пацієнтів із 36 обстежених. Їх титр був достатньо високим ($>1:320$), щоб діагностувати бартонельоз, спричинений *B. henselae*. В усіх цих осіб також встановлено ЛБ. Отже, у 5 (23,8 %) пацієнтів із 21 обстежених із ЛАП, в яких діагностовано ЛБ, виявляли ще й антитіла до *B. henselae*. Це свідчить про наявність у хворих поєднання ЛБ з бартонельозом, спричиненим *B. henselae*.

Для встановлення діагнозу хронічної EBV-інфекції у 36 хворих застосували два методи: РНІФ і ПЛР у режимі реального часу. Першим методом, технологія БЮЧИП, у сироватках крові обстежених пацієнтів виявляли антитіла класів М і G до кількох антигенів EBV одночасно (табл. 1). Наявність в усіх обстежених осіб антитіл класу G до вірусного капсидного антигену (EBV-CA) і його високоспецифічного рекомбінантного білка (p19),

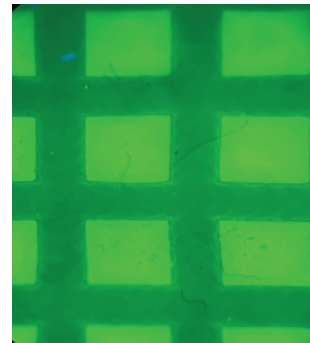


Мал. 3. Результати дослідження сироваток крові пацієнтів із ЛАП на наявність IgM та IgG до *B. burgdorferi s. l.* загалом за ІФА та імуноблотом, $n=36$, %.

нативного антигену (gp125), а також їх поєднання із специфічними антитілами класів М та G до інших антигенів вірусу дала підстави встановити їм діагноз хронічної EBV-інфекції.



Мал. 4. Світіння імунних комплексів антиген-антитіло, мічених флуоресцеїном, специфічних для *B. henselae*, у сироватці крові. Хвора В., 38 років. Діагноз: Лімфаденопатія. Бартонельоз, спричинений *B. henselae*. РНІФ, мікроскоп Olympus IX70, ок. $\times 10$, об. $\times 40$.



Мал. 5. Світіння імунних комплексів з антитіл класу G та EBV-CA gp125, мічених флуоресцеїном, у сироватці крові. Хворий Б., 36 років. Діагноз: Лімфаденопатія. Хронічна EBV-інфекція. РНІФ, мікроскоп Olympus IX70, ок. $\times 10$, об. $\times 20$.

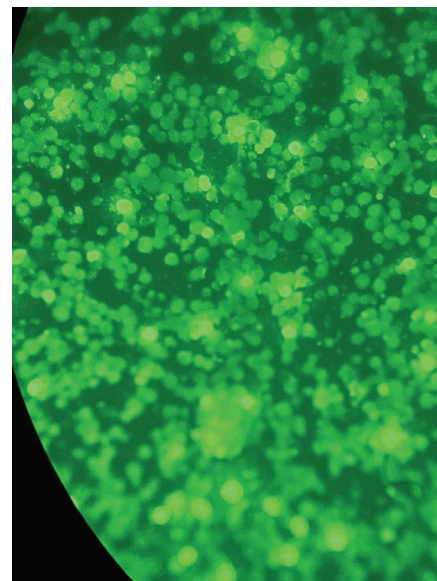
Примітка. На кольоровому малюнку – яскраво-зелене світіння комплексу антиген-антитіло у формі квадрату на темному полі.

Таблиця 1

Частота виявлення різних поєднань сироваткових антитіл класів М і G до антигенів EBV за допомогою РНІФ у пацієнтів із ЛАБ, n=36, %

Варіант поєднання IgG та IgM	Пацієнти	
	абс. число	%
IgG: EBV-CA + VCA gp125 + VCA p19 + EBNA	12	33,3
IgG: EBV-CA + VCA p19 + EBNA	11	30,6
IgG: EBV-CA + VCA p19 + EBV-EA + EBNA	3	8,3
IgG: EBV-CA + VCA gp125 + VCA p19 + EBNA IgM: EBV-CA + VCA p19	2	5,6
IgG: EBV-CA + VCA gp125 + VCA p19 IgM: EBV-CA + VCA p19	4	11,1
IgG: EBV-CA + VCA p19 IgM: EBV-CA + VCA p19	4	11,1
Разом	36	100

Для ілюстрації отриманих результатів наводимо клінічне спостереження. Пацієнт Б., 36 років, скаржився на тривале, понад 6 міс., збільшення підщелепових лімфатичних вузлів, артралгії, міалгії. Методом РНІФ у його сироватці крові виявлено антитіла класу G до EBV-CA та його нативного антигену gp125, специфічне світіння яких подано на мал. 5 і 6.



Мал. 6. Світіння імунних комплексів із антитіл класу G та EBV-CA, мічених флуоресцеїном, у сироватці крові. Хворий Б., 36 років. Діагноз: Лімфаденопатія. Хронічна EBV-інфекція. РНІФ, мікроскоп Olympus IX70, ок. $\times 10$, об. $\times 40$.

Примітка. На кольоровому малюнку – яскраво-зелене світіння комплексу антиген-антитіло у вигляді конюшини.

Для виявлення активної фази хронічної EBV-інфекції всім обстеженим пацієнтам визначали ДНК EBV за допомогою ПЛР у двох біологічних середовищах – кров і слина. Наявність нуклеїнової кислоти вірусу в достатньо

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

високої концентрації (10^3 - 10^7 копій/мл) свідчило про активну фазу хронічної EBV-інфекції.

ДНК EBV виявлено в 19 (52,8 %) із 36 пацієнтів із ЛАП і хронічною EBV-інфекцією. При цьому, нуклеїнову кислоту вірусу в слині детектували значно частіше ніж у крові – у 16 (84,2 %) проти 3 (15,8 %) осіб із 19 пацієнтів.

Таким чином, серед 36 пацієнтів із ЛАП і хронічною EBV-інфекцією у 19 (52,8 %) осіб встановлено активну фазу цієї хронічної вірусної інфекції, у решти 17 (47,2 %) недуга знаходилася в латентній фазі.

Далі у хворих із ЛАП з'ясовували варіанти поєднання інших інфекційних хвороб, зокрема ЛБ, бартофельозу,

спричиненого *B. henselae*, і хронічної EBV-інфекції в активній чи латентній фазі (табл. 2). Встановлено, що найчастіше в хворих діагностували ЛБ у поєднанні з хронічною EBV-інфекцією – у 15 (41,7 %) осіб із 36 обстежених, у тому числі в 11 остання недуга була в активній фазі, а в 4 – у неактивній.

У 5 (13,9 %) осіб діагностовано ЛБ у поєднанні з бартофельозом, спричиненим *B. henselae*, у тому числі у 2 – ще й з хронічною EBV-інфекцією в активній фазі, а у 3 – із хронічною EBV-інфекцією в латентній фазі. У 16 (44,4 %) пацієнтів із ЛАБ встановлено лише хронічну EBV-інфекцію, з них у 6 – активну фазу недуги, а у 10 – латентну фазу.

Таблиця 2

Частота виявлення ДНК EBV за допомогою ПЛР у пацієнтів із ЛАП окремо чи в поєднанні з хронічною EBV-інфекцією, ЛБ і бартофельозом, спричиненим *B. henselae*, n=36, %

ЛАП і хвороба	EBV ДНК (+) (n=19)		EBV ДНК (-) (n=17)		Разом (n=36)	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Лише ЛБ	11	57,9	4	23,5	15	41,7
ЛБ + бартофельоз	2	10,5	3	17,7	5	13,9
Лише ЛАП	6	31,6	10	58,8	16	44,4
Всього	19	100,0	17	100,0	36	100,0

Отже, при обстеженні хворих на ЛАП у 15 осіб діагностовано лише ЛБ, у 5 – ЛБ у поєднанні з бартофельозом, спричиненим *B. henselae*, з них у 2 – ще й з хронічною EBV-інфекцією в активній фазі, у 6 – лише хронічну EBV-інфекцію в активній фазі. Загалом у 72,2 % осіб встановлено наявність однієї чи кількох недуг одночасно. І тільки в 10 (27,8 %) із 36 обстежених відзначали хронічну EBV-інфекцію в латентній фазі.

Метод РНІФ (технологія БІОЧИП) з одночасним визначенням восьми специфічних антитіл одночасно для діагностики EBV-інфекції в пацієнтів із лімфаденопатією, мешканців Тернопільської області, застосований вперше і продемонстрував високу інформативність.

Отримані результати щодо діагностики хронічної EBV-інфекції в активній фазі у 52,8 % пацієнтів із ЛАП дещо перевищують дані науковців Японії, в дослідженнях яких відсоток хворих на цю недугу серед осіб із збільшеними лімфатичними вузлами склав 40,0 %, і нижчі від показників, наведених науковцями США, які спостерігали збільшення лімфатичних вузлів у 70,0 % осіб з такою патологією [30].

Висновки

1. Пацієнти з ЛАП частіше відзначали болі в суглобах (55,6 %), безсоння і/або хронічне недосипання (47,6 %), підвищення температури тіла (44,5 %), зниження здат-

ності до виконання точних дій (36,1 %), підвищену втому/загальну слабкість (33,3 %), рідше – зниження пам'яті та уваги (30,6 %), емоційну лабільність (27,8 %), болі в м'язах (16,7 %), неприємні відчуття в горлі та утруднене носове дихання (по 11,1 %).

2. Укусів кліщів зазнали 50,0 % хворих із ЛАП. Ці членистоногі суттєво частіше нападали під час перебування пацієнтів в лісі та на садово-городніх ділянках, кусали здебільшого в нижні кінцівки, $p < 0,05$.

3. Почергове використання ІФА та імуноблоту дозволило діагностувати ЛБ у 55,6 % пацієнтів із ЛАП. У 13,9 % хворих із лімфаденопатією, поєднаною з ЛБ, за допомогою реакції непрямой імунофлуоресценції, технологія БІОЧИП, виявлено ще й бартофельоз, спричинений *B. henselae*.

4. Метод мультиплексної непрямой імунофлуоресценції з використанням технології БІОЧИП (за рахунок одночасної детекції в одному зразку сироватки крові антитіл класів М і G до капсидного антигену вірусу Епштейна-Барр та його білків gp125 і p19, класу G – до ядерного і раннього антигенів вірусу) дав змогу діагностувати хронічну EBV-інфекцію в усіх пацієнтів із ЛАП. За допомогою полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі активну фазу хронічної EBV-інфекції встановлено у 52,8 % пацієнтів, у решти 47,2 % – латентну фазу.

5. У 72,2 % хворих із ЛАП діагностовано ЛБ, бартофельоз, спричинений *B. henselae*, та активну фазу хронічної EBV-інфекції як окремо, так і в різних поєднаннях.

6. Пацієнтів із ЛАП доцільно обстежувати щодо можливої одночасної наявності у них ЛБ, бартофельозу та хронічної EBV-інфекції.

Література

- Mateiko, G. B., & Gorbali, N. B. (2014). Differential diagnosis of lymphadenopathy syndrome in the practice of a paediatrician. *Children's Doctor*, 6 (35), 8-12 [in Ukrainian].
- Mahajan, V. (2023). Lyme disease: An overview. *Indian Dermatology Online Journal*, 14(5), 594.
- Lymphadenopathy - StatPearls - NCBI bookshelf. (2023, August 8). National Center for Biotechnology Information. [www.ncbi.nlm.nih.gov](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558918/). Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558918/>
- Gaddey, H. L., & Riegel, A. M. (2016). Unexplained lymphadenopathy: evaluation and differential diagnosis. *American Family Physician*, 94(11), 896-903.
- Bron, G. M., Fenelon, H., & Paskewitz, S. M. (2021). Assessing recognition of the vector of Lyme disease using resin-embedded specimens in a Lyme endemic area. *Journal of Medical Entomology*, 58(2), 866-872.
- Radolf, J. D., Strle, K., Lemieux, J. E., & Strle, F. (2021). Lyme disease in humans. *Current Issues in Molecular Biology*, 42(1), 333-384.
- Karvonen, K., Nykky, J., Marjomäki, V., & Gilbert, L. (2021). Distinctive evasion mechanisms to allow persistence of *Borrelia burgdorferi* in different human cell lines. *Frontiers in Microbiology*, 12, 711291.
- Molins, C. R., Ashton, L. V., Wormser, G. P., Andre, B. G., Hess, A. M., Delorey, M. J., ... & Belisle, J. T. (2017). Metabolic differentiation of early Lyme disease from southern tick-associated rash illness (STARI). *Science Translational Medicine*, 9(403), eaal2717.
- Smiyan, S., Galaychuk, I., Zhulkevych, I., Nykolyuk, V., Komorovsky, R., Gusak, S., & Bilozetsky, I. (2019). Sjögren's syndrome and lymphadenopathy unraveling the diagnosis of Lyme disease. *Reumatologia/Rheumatology*, 57(1), 59-62.
- Guérin, M., Shawky, M., Zedan, A., Octave, S., Avelle, B., Maffucci, I., & Padiolleau-Lefèvre, S. (2023). Lyme borreliosis diagnosis: State of the art of improvements and innovations. *BMC microbiology*, 23(1), 204.
- Bobbe, J. R., Jutras, B. L., Horn, E. J., Embers, M. E., Bailey, A., Moritz, R. L., ... & Fallon, B. A. (2021). Recent progress in Lyme disease and remaining challenges. *Frontiers in Medicine*, 1276.
- Sykes, R. A., & Makiello, P. (2017). An estimate of Lyme borreliosis incidence in Western Europe. *Journal of Public Health*, 39(1), 74-81.
- Marques, A. R., Strle, F., & Wormser, G. P. (2021). Comparison of Lyme disease in the United States and Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 27(8), 2017.
- Cook, M. J., & Puri, B. K. (2020). Estimates for Lyme borreliosis infections based on models using sentinel canine and human seroprevalence data. *Infectious Disease Modelling*, 5, 871-888.
- Andreychyn, M., Pańczuk, A., Shkilna, M., Tokarska-Rodak, M., Korda, M., Koziol-Montewka, M., & Klishch, I. (2017). Epidemiological situation of Lyme borreliosis and diagnosis standards in Poland and Ukraine. *Health Problems of Civilization*, 11(3), 190-194.
- Andreychyn, M. A., Korda, M. M., Shkilna, M. I., Ivakhiv, O. L., Andreychyn, S. M., Bilkevych, N. A., ... & Yuskevych, V. V. (2021). Lyme Borreliosis. *Ternopil: TNMU* [in Ukrainian].
- Luan, Y., Gou, J., Zhong, D., Ma, L., Yin, C., Shu, M., ... & Lin, Q. (2023). The Tick-Borne Pathogens: An Overview of China's Situation. *Acta Parasitologica*, 68(1), 1-20.
- Sprong, H., Azagi, T., Hoornstra, D., Nijhof, A. M., Knorr, S., Baarsma, M. E., & Hovius, J. W. (2018). Control of Lyme borreliosis and other Ixodes ricinus-borne diseases. *Parasites & Vectors*, 11, 1-16.
- Tokarz, R., Tagliaferro, T., Cucura, D. M., Rochlin, I., Sameroff, S., & Lipkin, W. I. (2017). Detection of *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia microti*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia miyamotoi*, and Powassan virus in ticks by a multiplex real-time reverse transcription-PCR assay. *MSphere*, 2(2), 10-1128.
- Berghoff, W. (2012). Suppl 1: Chronic Lyme Disease and Co-infections: Differential Diagnosis. *The Open Neurology Journal*, 6, 158.
- Maly V. P., Andreychyn, M. A. (Eds.). (2023). Infectious diseases: a textbook (Ed. 3). Vol. 2. Lviv: *Mahnohliya, 2006* [in Ukrainian].
- Lins, K. D. A., Drummond, M. R., & Velho, P. E. N. F. (2019). Cutaneous manifestations of bartonellosis. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 94, 594-602.
- Pokrovskaya, T. (2015). Chronic Epstein-Barr virus infection – actual questions. *Infectious Diseases – Infektsiyni khvoroby*, 3 [in Ukrainian].
- Damania, B., Kenney, S. C., & Raab-Traub, N. (2022). Epstein-Barr virus: Biology and clinical disease. *Cell*.
- Hatton, O. L., Harris-Arnold, A., Schaffert, S., Krams, S. M., & Martinez, O. M. (2014). The interplay between Epstein-Barr virus and B lymphocytes: implications for infection, immunity, and disease. *Immunologic Research*, 58, 268-276.
- Tcherniaeva, I., den Hartog, G., Berbers, G., & van der Klis, F. (2018). The development of a bead-based multiplex immunoassay for the detection of IgG antibodies to CMV and EBV. *Journal of Immunological Methods*, 462, 1-8.
- Chen, H., Chen, S., Lu, J., Wang, X., Li, J., Li, L., ... & Liu, W. (2017). Multiparametric detection of antibodies against different EBV antigens to predict risk for nasopharyngeal carcinoma in a high-risk population of China. *Cancer Prevention Research*, 10(9), 542-550.
- Zavidnyuk, N. H. (2016). Actual problems of Epstein-Barr viral infection diagnostics. *Infectious Diseases – Infektsiyni khvoroby*, (4) [in Ukrainian].
- A set of reagents for the determination of human antibodies of classes M and G to Epstein-Barr Virus BIOCHIP Sequence EBV antigens (with avidity determination) (Cat. No.: FI 2799-21 X) (2023, August 28). EUROIMMUN AG. [www.euroimmun.com](https://www.euroimmun.com/products/infectiondiagnostics/id/herpesvirus-infections/). Retrieved from <https://www.euroimmun.com/products/infectiondiagnostics/id/herpesvirus-infections/>
- Kimura, H., & Cohen, J. I. (2017). Chronic active Epstein-Barr virus disease. *Frontiers in Immunology*, 8, 1867.

DETECTION OF LYME-BORRELIOSIS, BARTONELLOSIS AND EPSTEIN-BARR VIRAL INFECTION IN PATIENTS WITH LYMPHADENOPATHY, RESIDENTS OF TERNOPIL REGION

M. A. Andreychyn, T. I. Yuzkiv, M. T. Huk, M. I. Shkilna, O. L. Ivakhiv, I. S. Ischuk, N. H. Zavidniuk

I. Horbachevsky Ternopil National Medical University

SUMMARY. *The aim* – to examine residents of the Ternopil region with lymphadenopathy using serological and molecular genetic methods for the presence of Lyme-borreliosis, bartonellosis, EBV infection and their combination.

Patients and methods. *In the Center for Lyme-borreliosis and other tick-borne diseases research at the I. Horbachevsky Ternopil National Medical University were examined 36 patients aged 19 to 76 who were diagnosed with lymphadenopathy (LAP). There were 9 (25.0 %) men, 27 (75.0 %) women. 26 (72.2 %) persons lived in the city, 10 (27.8 %) lived in the countryside.*

For detection of IgM and/or IgG to B. burgdorferi s. l. in blood serum, a two-stage scheme (ELISA and immunoblot) was used, using the test systems of the company Euroimmun AG (Germany). The obtained results were analyzed in accordance with the recommendations of the manufacturer of the test systems. Antibodies of class G to Bartonella henselae and Bartonella quintana in the blood serum of patients were determined using the method of multiplex indirect immunofluorescence, using the test systems «Mosaic for Bartonella henselae/Bartonella quintana (IgG)», the company Euroimmun AG (Germany), BIOCHIP technology, which contained fluorescein-labeled antigens of the specified Bartonella species.

The results of the determination of specific antibodies to B. henselae and B. quintana and the indicated antigens of EBV-infection were evaluated in the field of view of a fluorescent microscope (Olympus IX70, glasses×10, lens×20;40) by the bright green glow of the antigen-antibody immune complex labeled with fluorescein.

For the diagnosis of EBV infection, the indirect immunofluorescence multiplex reaction (BIOCHIP technology) was used. The test system “BIOCHIP Sequence EBV (with avidity determination)” (EUROIMMUN, Germany) was used, which contains the capsid antigen and its proteins gp125 and p19, nuclear and early antigens of EBV.

To establish the active or latent phase of chronic EBV infection, real-time PCR was used, with the help of which

EBV DNA was determined in the blood plasma and saliva of the examined patients. The active phase of chronic EBV-infection was diagnosed by the presence of EBV DNA in blood and saliva (in both or one sample; detection range – 10^3 - 10^7 copies/ml). In the absence of viral DNA in blood or saliva, the latent phase of chronic EBV infection was established.

Results. *50.0 % of patients with lymphadenopathy were bitten by ticks, mostly in the lower limbs, significantly more often during their stay at the forest and gardens, $p < 0.05$.*

The alternate use of ELISA and immunoblot made it possible to diagnose Lyme borreliosis in 55.6 % of patients with lymphadenopathy. Specific IgG antibodies only to B. henselae were diagnosed in the blood serum of 13.9 % of patients with lymphadenopathy associated with Lyme borreliosis. The indirect immunofluorescence multiplex reaction method (BIOCHIP technology) made it possible to diagnose chronic EBV infection in all patients with lymphadenopathy. With the help of polymerase chain reaction in real time, the active phase of chronic EBV-infection was established in 52.8 % of patients, the latent phase – in 47.2 % of patients. 72.2 % of patients with lymphadenopathy were diagnosed with Lyme borreliosis, bartonellosis caused by B. henselae, and the active phase of chronic EBV-infection both as individually and so in various combinations.

Conclusion. *Patients with lymphadenopathy should be screened for possible concurrent Lyme disease, bartonellosis, and chronic EBV-infection. The indirect immunofluorescence multiplex reaction method (BIOCHIP technology) with determination of eight specific antibodies at the same time for the diagnosis of EBV-infection in patients with lymphadenopathy, residents of the Ternopil region, was used for the first time and demonstrated high informativeness.*

Key words: *lymphadenopathy; Lyme-borreliosis; bartonellosis; EBV-infection; multiplex indirect immunofluorescence; BIOCHIP technology; polymerase chain reaction; immunoblot.*

Відомості про авторів:

Андрейчин Михайло Антонович – академік НАМН України, д. мед. наук, професор, завідувач кафедри інфекційних хвороб з епідеміологією, шкірними та венеричними хворобами, Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України; e-mail: andreychyn@tdmu.edu.ua

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0154-730X>

Юзьків Тетяна Іванівна – аспірантка кафедри інфекційних хвороб з епідеміологією, шкірними та венеричними

хворобами, Тернопільський національний медичний університет ім. І. Я. Горбачевського МОЗ України; e-mail: yuzkiv@tdmu.edu.ua

ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-6140-2388>

Гук Мар'яна Тарасівна – докторка філософії, асистентка кафедри інфекційних хвороб з епідеміологією, шкірними та венеричними хворобами, Тернопільський національний медичний університет ім. І. Я. Горбачевського МОЗ України; e-mail: huk@tdmu.edu.ua

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3323-6987>

Шкільна Марія Іванівна – д. мед. наук, професорка кафедри інфекційних хвороб з епідеміологією, шкірними та венеричними хворобами, Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України; e-mail: shkinami@tdmu.edu.ua

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0915-5071>

Івахів Олег Любомирович – канд. мед. наук, доцент кафедри інфекційних хвороб з епідеміологією, шкірними та венеричними хворобами, Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України; e-mail: ivakhiv@tdmu.edu.ua

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1917-1814>

Іщук Інна Станіславівна – канд. мед. наук, доцентка кафедри інфекційних хвороб з епідеміологією, шкірними та венеричними хворобами, Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України; e-mail: ischuk@tdmu.edu.ua

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-4318-4834>

Завіднюк Наталія Григорівна – канд. мед. наук, доцентка кафедри інфекційних хвороб з епідеміологією, шкірними та венеричними хворобами, Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України; e-mail: zavidnyuk_ng@tdmu.edu.ua

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3782-150X>

Information about the authors:

Andreychyn M. A. – Academician of the NAMS of Ukraine, Professor, MD, the Head of the Department of Infectious

Diseases with Epidemiology, Dermatology and Venerology, I. Horbachevsky Ternopil National Medical University; e-mail: andreychyn@tdmu.edu.ua

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0154-730X>

Yuzkiv T. I. – PhD student, Department of Infectious Diseases with Epidemiology, Dermatology and Venerology, I. Horbachevsky Ternopil National Medical University; e-mail: yuzkiv@tdmu.edu.ua

ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-6140-2388>

Huk M. T. – PhD, MD, Assistant Professor, Department of Infectious Diseases with Epidemiology, Dermatology and Venerology, I. Horbachevsky Ternopil National Medical University; e-mail: huk@tdmu.edu.ua

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3323-6987>

Shkilna M. I. – DSc, MD, Professor, Department of Infectious Diseases with Epidemiology, Dermatology and Venerology, I. Horbachevsky Ternopil National Medical University; e-mail: shkinami@tdmu.edu.ua

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0915-5071>

Ivakhiv O. L. – PhD, Associate Professor, Department of Infectious Diseases with Epidemiology, Dermatology and Venerology, I. Horbachevsky Ternopil National Medical University; e-mail: ivakhiv@tdmu.edu.ua

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1917-1814>

Ishchuk I. S. – PhD, Associate Professor, Department of Infectious Diseases with Epidemiology, Dermatology and Venerology, I. Horbachevsky Ternopil National Medical University; e-mail: ischuk@tdmu.edu.ua

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-4318-4834>

Zavidniuk N. H. – PhD, Associate Professor, Department of Infectious Diseases with Epidemiology, Dermatology and Venerology, I. Horbachevsky Ternopil National Medical University; e-mail: zavidnyuk_ng@tdmu.edu.ua

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3782-150XX>

Конфлікт інтересів: немає.

Authors have no conflict of interest to declare.

Отримано 15.03.2024 р.