

15. Casalegno J.-S., Ferraris O., Escuret V., Bouscambert M., Bergeron C., Lines L. et al. Functional balance between the hemagglutinin and neuraminidase of the influenza A(H1N1)pdm09 HA D222 variants. *PLoS ONE*. 2014; 9 (8): e104009.
16. Danilenko D.M. Analysis of evolutionary changeability and biological properties of pandemic A(H1N1)pdm09 influenza viruses that circulated in Russia from 2009 to 2013: Author's abstract of PhD thesis. Saint-Petersburg; 2014 (in Russian).
17. Nelson M.I., Simonsen L., Viboud C., Miller M.A., Taylor J., George K. et al. Stochastic processes are key determinants of short-term evolution in influenza A virus. *PLoS Pathog.* 2006; 2: e138.
18. Konovalova N.I. Evolutionary changeability of influenza A viruses that circulated in Russia in 1997 – 2007: Doctorate of ... med. sci. diss. Saint-Petersburg; 2009 (in Russian).
19. World Health Organization Influenza Centre. NIMR interim report September 2014. Available at: <http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/NIMR-VCM-report-Sep-14-web.pdf>.
20. Danilenko D.M., Smirnova T.D., Gudkova T.M., Eropkin M.Yu., Kiselev O.I. Comparative study of susceptibility of cell lines of various origin to pandemic H1N1v, avian, swine and human seasonal influenza viruses. *Voprosi Virusologii*. 2011; 56 (6): 14 – 19 (in Russian).

Применение мультиплексного иммуночипового анализа (ФОСФАН™) и полимеразной цепной реакции для лабораторной диагностики иксодовых клещевых боррелиозов

Т.И. Кузнецова¹, В.Г. Помелова² (v.pomelova@immunoscreen.ru),
Э.И. Коренберг³, Н.С. Осин⁴

¹ГБУЗ Пермского края «Пермская краевая клиническая инфекционная больница», Пермь

²ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт биологического приборостроения» ФМБА России, Москва

³ФГБУ «ФНИЦЭМ им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва

⁴ЗАО «Иммюноскрин», Москва

Резюме

Оценена эффективность применения методов мультиплексного иммуночипового анализа (ФОСФАН™) на основе пептида С6 и полимеразной цепной реакции (nested ПЦР) для лабораторной диагностики иксодовых клещевых боррелиозов (ИКБ). Исследование проведено с участием 155 больных с локализованной и диссеминированной стадией заболевания, в том числе с микст-инфекцией с гранулоцитарным анаплазмозом человека. Положительные результаты в ФОСФАН зарегистрированы соответственно у $78 \pm 7,7$ и $91 \pm 11,7\%$ пациентов с эритемной или безэритемной формой ИКБ, в ПЦР – у $26 \pm 8,2$ и $72 \pm 17,1\%$. Максимальная частота выявления положительных проб обоими методами наблюдалась в основном на 2 – 4-й неделе от начала заболевания или на 22 – 35-й день после присасывания клеща. В целом ФОСФАН обеспечивал серологическое подтверждение заболевания ИКБ у 52 из 55 ($94,5 \pm 6,2\%$) больных, в крови которых была обнаружена ДНК боррелий. Лишь 3 пациента с положительным результатом ПЦР (один – с эритемной и два – с безэритемной формой ИКБ) оказались серонегативными. Полученные данные подтверждают высокую эффективность ФОСФАН для серологической верификации ИКБ как на локализованной, так и на диссеминированной стадии болезни. Применение ПЦР (в дополнение к ФОСФАН) целесообразно в определенные сроки (не позднее 2 – 3-й недели от начала заболевания) в случаях, когда необходимо уточнить диагноз у серонегативных больных, имеющих клинические признаки, характерные для безэритемной формы, или нетипичные кожные проявления, вызывающие сомнения при постановке диагноза эритемной формы ИКБ.

Ключевые слова: иксодовые клещевые боррелиозы, гранулоцитарный анаплазмоз человека, мультиплексный иммуночиповый анализ ФОСФАН™, пептид С6, рекомбинантный белок VisE, nested ПЦР

The Use of Multiplex Phosphorescence Analysis (PHOSPHAN™) and Polymerase Chain Reaction for Laboratory Diagnosis of Ixodid Tick-borne Borrelioses

T.I. Kuznetsova¹, V.G. Pomelova² (v.pomelova@immunoscreen.ru), E.I. Korenberg³, N.S. Osin⁴

¹State Budgetary Healthcare Institution «Perm' Regional Clinical Infectious Diseases Hospital» of Perm'

²Federal State Unitary Enterprise «Institute for Biological Instrumentation» of the Federal Biomedical Agency of Russia, Moscow

³Federal State Budgetary Institution «Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named honorary academician N.F. Gamaleya» of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

⁴Closed Joint Stock Company «Immunoscreen», Moscow

Abstract

In this report, we evaluated the performance of C6 peptide based multiplex Phosphorescence Analysis (PHOSPHANTM) and Polymerase Chain Reaction (nested PCR) for laboratory diagnosis of Ixodid Tick-borne Borrelioses (ITBB). The study was conducted on 155 patients with localized and disseminated stages of the disease, the cases of mixed infection with ITBB and human granulocytic anaplasmosis including. Positive PHOSPHAN reactions were observed in $78 \pm 7.7\%$ of patients with erythema migrans (EM) and $91 \pm 11.7\%$ of patients without cutaneous manifestations of the disease. The frequency of PCR positive samples was lower, $26 \pm 8.2\%$ and $72 \pm 17.1\%$ respectively. The maximum frequency of positive samples detected by both methods was mainly observed at 2 – 4 week from the onset of the disease (or 22 – 35 day after tick bite). In general, PHOSPHAN provided serologic confirmation of the disease in 52 of 55 ($94.5 \pm 6.2\%$) patients, whose blood contained *Borrelia* DNA. Only 3 patients tested positive in PCR (1 – with EM and 2 – without this skin manifestation) were seronegative. These data confirmed the high efficiency of PHOSPHAN method for serologic verification of ITBB both at localized and disseminated stages of the disease. The use of PCR (in addition to PHOSPHAN) is appropriate within a certain period of time (no later than 2 – 3 weeks from the onset of the disease) to clarify the diagnosis in seronegative patients having clinical signs of disseminated non-cutaneous form of ITBB, or atypical cutaneous manifestations of erythematous form of the disease.

Key words: ixodid tick-borne borrelioses, human granulocytic anaplasmosis, multiplex microarray immunoassay PHOSPHAN™, C6 peptide; recombinant protein VlsE, nested PCR

Введение

В настоящее время метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) рассматривают как дополнительный к серологическим методам при лабораторном подтверждении заболевания иксодовым клещевым боррелиозом (ИКБ) [1 – 3]. Хотя в целом данные о соответствии между результатами выявления антител к *Borrelia burgdorferi sensu lato* и детекции ДНК возбудителя в ПЦР противоречивы, считается, что применение ПЦР особенно целесообразно на ранней серонегативной стадии заболевания до получения серологического ответа, а также в случаях, когда серологические методы дают неубедительные результаты [4]. В недавнем российском исследовании [3], проведенном на репрезентативной выборке проб крови от больных ИКБ, чувствительность ПЦР оказалась наиболее высокой ($69.9 \pm 9.5\%$) на второй неделе от начала заболевания, что совпало с оптимальными сроками изоляции боррелий из крови пациентов культуральным методом, то есть со сроками наиболее выраженной боррелиемии [5]. При этом у пациентов с локализованной стадией ИКБ чувствительность ПЦР была существенно выше по сравнению с отечественной тест-системой на основе иммуноферментного анализа (ИФА) вплоть до 21-го дня от начала болезни [6].

В последние годы удалось существенно повысить чувствительность, специфичность и информативность серологических исследований благодаря появлению новых серологических тестов, таких как мультиплексный иммуночиповый анализ ФОСФАН™ [7, 8]. Это обусловило необходимость проведения исследований, направленных на сравнение эффективности методов ФОСФАН и ПЦР для подтверждающей диагностики ИКБ.

Цель работы – сравнить чувствительность методов ФОСФАН и ПЦР и оценить диагностическую эффективность их сочетанного применения для лабораторного подтверждения ИКБ в остром периоде заболевания.

В работе приведены также данные, позволяющие сравнить чувствительность этих методов и двух вариантов коммерческих иммуноферментных тест-систем, предназначенных для выявления иммуноглобулинов М и G к *B. burgdorferi sensu lato*.

Материалы и методы

Сыворотки и сухие пятна цельной крови больных ИКБ. Сыворотки ($n = 373$) и высушенные на бумаге пятна цельной крови ($n = 374$) были собраны в Пермском крае в эпидемический сезон (с мая по сентябрь) 2010 года от 155 больных с клиническим диагнозом ИКБ. Для оценки диагностической эффективности методов ФОСФАН и ПЦР пациенты были разделены на 3 группы. Группа 1 (ИКБ1) и группа 2 (ИКБ1 + ГАЧ) состояли соответственно из 93 (моноинфекция) и 30 (в сочетании с ГАЧ) больных с локализованной стадией ИКБ (эритемная форма). Группа 3 состояла из 9 (моноинфекция) и 23 (в сочетании с ГАЧ) больных с диссеминированной стадией ИКБ (безэритемная форма). Подробное описание и клинико-диагностическая характеристика этих пациентов приведены ранее [9]. Все пациенты отмечали присасывание клеща до начала заболевания.

Пробы крови и результаты их исследования методами ИФА (в тест-системе компании Омникс, Санкт-Петербург) и ПЦР любезно предоставил сотрудник краевой клинической инфекционной больницы № 1 г. Перми В.Ю. Тетерин. Сведения о больных и полученные от них пробы анализировали ретроспективно после удаления информации, позволяющей идентифицировать пациентов.

Выполнение ИФА. Пробы от больных с локализованной стадией ИКБ протестированы на наличие общих IgM и IgG в тест-системе С6 ELISA Immunetics (Immunetics Inc., США) в соответствии с инструкциями производителя.

Выполнение ФОСФАН. ФОСФАН – это твердофазный сэндвич-иммуноанализ, который проводится в лунках стандартных полистироловых ми-

кропланшетов (Maxisorb, Nunc, Дания) аналогично ИФА [7]. На дне лунок микропланшета с помощью наноплоттера для контактной печати (ЗАО «Иммуноскрин», Москва) напечатаны микрозоны (диаметром 0,7 мм каждая) с пептидом С6 (для определения IgM и IgG) и белками OspC или VisE (для определения IgM). Этапы выполнения иммуноанализа подробно описаны ранее [8]. Результат считали положительным (антитела выявлены), если значение коэффициента позитивности (Кпоз.) было ≥ 1 . Чувствительность ФОСФАН (в %) рассчитывали как долю положительных проб, содержащих IgM и IgG к пептиду С6, по отношению к общему числу исследованных проб.

Выполнение ПЦР. Этапы выполнения nested ПЦР с использованием родоспецифичных праймеров *B. burgdorferi sensu lato*, фланкирующих участок 5S-23S рНК спейсера, описаны ранее [3, 6].

Статистическая обработка результатов. Выявление статистически значимых различий выборок по качественным показателям (сравнение долей) проводили с помощью точного двустороннего критерия Фишера для уровня статистической значимости $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Частота выявления IgM, IgG и ДНК боррелий на локализованной стадии моноинфекции ИКБ. На локализованной стадии моноинфекции ИКБ иммуноглобулины М и G наиболее часто регистрировали в тестах на основе пептида С6: ФОСФАН ($56,2 \pm 6,8\%$) и С6 ELISA Immunetics ($38,5 \pm 6,7\%$) и достоверно реже ($p < 0,05$) в иммуноферментной тест-системе компании Омникс ($4,7 \pm 3\%$). Частота детекции ДНК боррелий методом ПЦР составила лишь $6,9 \pm 3,6\%$ (табл. 1).

Специфические антитела в ИФА-Омникс и ДНК в ПЦР чаще всего обнаруживали на 3 – 4 неделе от начала болезни. Чувствительность детекции этих маркеров была низкой: примерно 11% (ИФА-

Омникс) и 18% (ПЦР). На первой неделе результаты ИФА-Омникс были отрицательными, а метод ПЦР позволял выявить ДНК боррелий лишь в 4,5% проб (рис. 1 А).

Достоверные преимущества ФОСФАН в чувствительности по сравнению с ИФА-Омникс и ПЦР ($p < 0,05$) наблюдали на всех сроках после начала заболевания ИКБ (см. рис. 1А). Положительный результат ФОСФАН регистрировали примерно в $30 \pm 12,1\%$ сывороток уже на первой неделе с максимумом $86 \pm 14\%$ на 15 – 28-й день. Характер кривой «доля положительных проб/срок от начала болезни» свидетельствует об активном формировании антител к пептиду С6 по мере развития инфекционного процесса, что подтверждается данными о высокой частоте сероконверсии IgG к этому пептиду (и IgM к белку VisE) [9].

Значительная часть антител, регистрируемых в ФОСФАН с 1-го по 7-й день болезни, обнаруживалась уже на первой неделе от присасывания клеща (рис. 1Б). Ранее аналогичные данные были получены в С6 ELISA Immunetics [9]. При эритемной форме моноинфекции ИКБ положительный результат обусловлен в основном наличием иммуноглобулинов G в тестах с пептидом С6 [9, 10]. Специфический характер регистрируемого гуморального иммунного ответа подтверждается данными о высокой частоте сероконверсии, выявленной в этом тесте у пациентов первой группы [9]. Вместе с тем с учетом сведений о возможности длительной персистенции антител в отсутствие лечения [10, 11] нельзя исключить, что у части исследованных пациентов положительная реакция с пептидом С6, особенно в дебюте заболевания, могла отражать предшествующий контакт с возбудителем.

Результаты тестирования в ИФА-Омникс и в ПЦР на первой неделе после присасывания клеща были отрицательными (рис. 1Б). Чувствительность этих тестов на всех сроках от присасывания была достовер-

Таблица 1.
Частота выявления иммуноглобулинов М и G к *B. burgdorferi sensu lato* и ДНК возбудителей ИКБ методами ФОСФАН, ИФА и ПЦР в пробах крови обследованных пациентов (обозначение групп больных приведено в тексте)

Группа больных ИКБ	Число (%) положительных проб с IgM, IgG или ДНК боррелий в тесте							
	ФОСФАН		ИФА (Иммунетикс)		ИФА (Омникс)		ПЦР	
	Абс.	% (P ± tm)	Абс.	% (P ± tm)	Абс.	% (P ± tm)	Абс.	% (P ± tm)
ИКБ1	122/217	56,2 ± 6,8*	75/195	38,5 ± 6,7*	10/214	4,7 ± 3*	15/217	6,9 ± 3,6*
ИКБ1 + ГАЧ	70/78	89,7 ± 7,4*	61/72	84,7 ± 8,6*	22/74	29,7 ± 10,8*	28/78	35,1 ± 10*
ИКБ2	54/78	69,2 ± 9,7	25/48	52,1 ± 14,4	36/76	47,4 ± 11,3	33/79	41,8 ± 10,9
Всего	246/373	66,0 ± 4,8	161/315	51,1 ± 5,5	65/364	17,9 ± 3,9	76/374	20,3 ± 4,1

Примечание: *Достоверность различий между группами ИКБ1 и ИКБ1 + ГАЧ при исследовании проб крови данным методом ($p \leq 0,05$).

Рисунок 1.

Частота выявления IgM, IgG и ДНК боррелий в пробах больных с локализованной стадией моноинфекции ИКБ на разных сроках: от начала заболевания (А) или после присасывания клеща (Б) методами ФОСФАН, ИФА и ПЦР

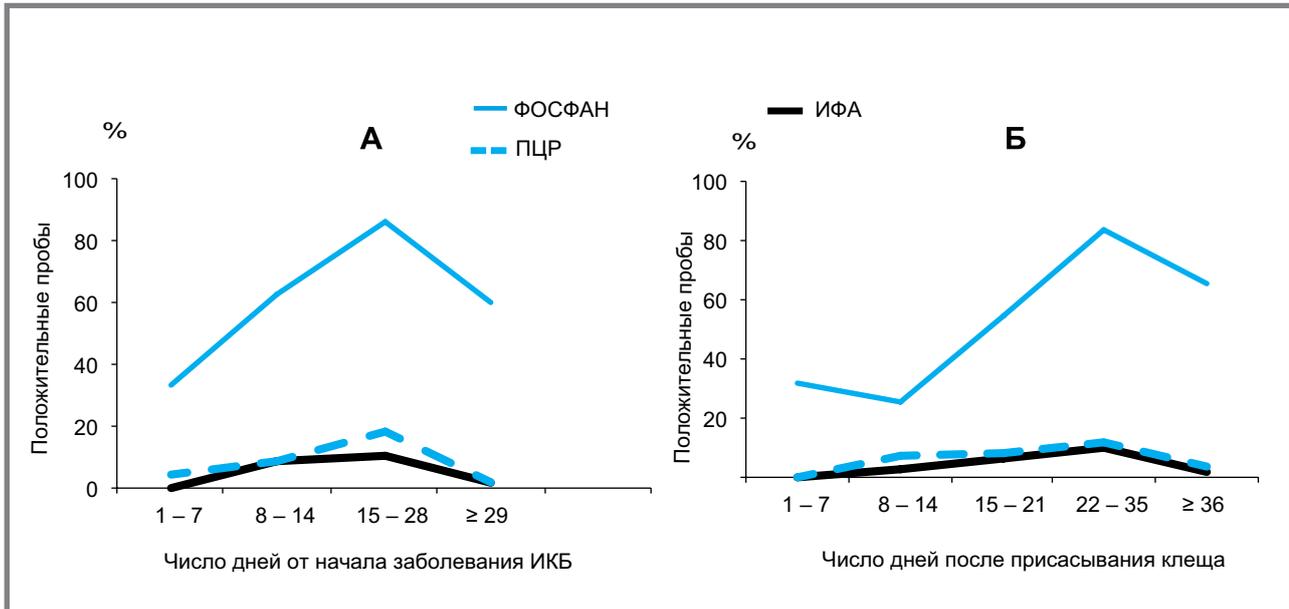
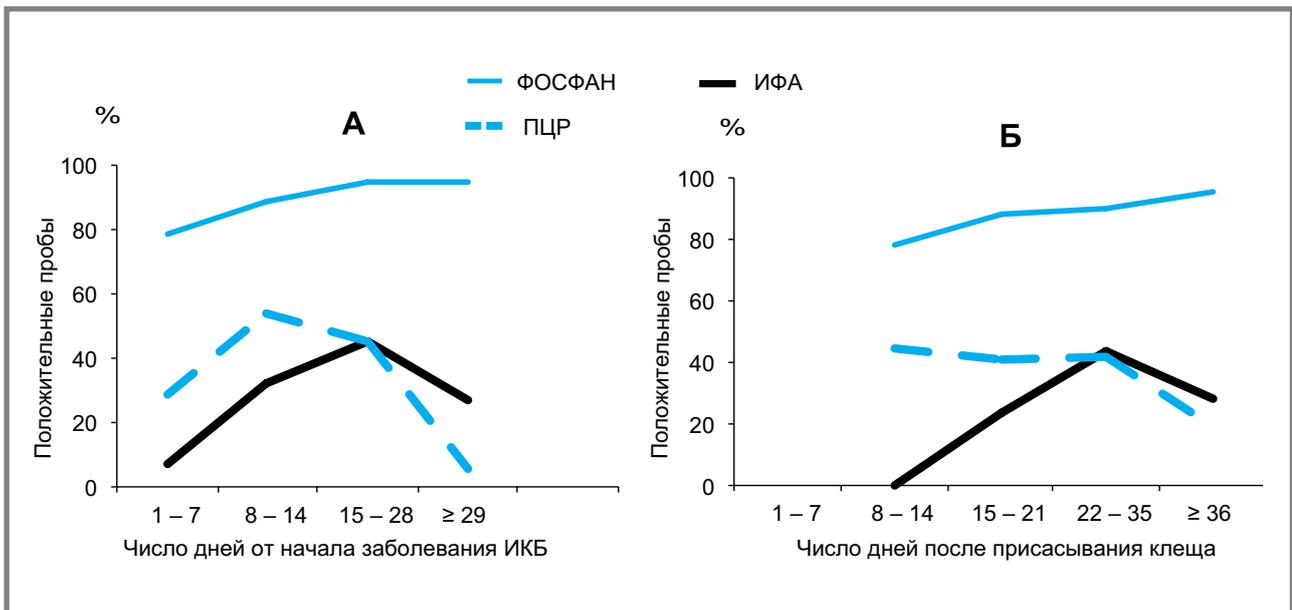


Рисунок 2.

Частота выявления IgM, IgG и ДНК боррелий в пробах больных с локализованной стадией ИКБ (при коинфекции с ГАЧ) на разных сроках: от начала заболевания (А) или после укуса клеща (Б) методами ФОСФАН, ИФА и ПЦР



но ниже ($p < 0,05$) по сравнению с исследованием в ФОСФАН. Максимальная частота выявления положительных проб отмечена на 22 – 35-й день от укуса, что соответствует данным ФОСФАН и ИФА-Иммунетикс [9]. Характер кривой «доля положительных проб/срок от присасывания клеща» в тест-системе ИФА-Омникс в значительной степени отражает особенности формирования IgM к рекомбинантным белкам OspC и VlsE [9], которые составляют основу этого теста.

Частота выявления IgM, IgG и ДНК боррелий при локализованной стадии ИКБ в сочетании с ГАЧ. При микст-инфекции с ГАЧ пробы с IgM, IgG или ДНК боррелий выявляли достоверно чаще ($p < 0,05$),

чем при моноинфекции ИКБ. Чувствительность тестов на основе пептида С6 (85 – 89%) существенно превышала этот показатель для методов ИФА-Омникс и ПЦР (см. табл. 1).

Специфические антитела в ИФА-Омникс и ДНК в ПЦР чаще всего обнаруживали на 2 – 4-й неделе от начала болезни (в 45 – 54% исследованных проб). На 1-й неделе положительные результаты этих методов зарегистрированы примерно в 7 и 29% проб соответственно. Частота выявления положительных проб в ФОСФАН на всех сроках заболевания, кроме 1-й недели, была достоверно выше ($p < 0,05$) с максимумом $95,2 \pm 12\%$ на 15 – 28-й день (рис. 2А).

Значительная часть положительных проб, регистрируемых методами ФОСФАН и ПЦР с 1-го по 7-й день болезни, обнаруживалась на ранних сроках после укуса клеща. При анализе первых порций сывороток, полученных начиная со 2-й недели от укуса (отсутствие «ранних» проб при коинфекции с ГАЧ объясняется более поздним поступлением пациентов этой группы в стационар [9]), положительные результаты в ФОСФАН и ПЦР установлены для 78 ± 33 и $44 \pm 38\%$ проб соответственно (рис. 2Б). Достоверные преимущества ФОСФАН в чувствительности по сравнению с ИФА-Омникс и ПЦР ($p < 0,05$) наблюдали на всех сроках, начиная с третьей недели после присасывания клеща.

В целом совокупность полученных серологических результатов и данных ПЦР свидетельствует о диссеминации и накоплении боррелий в крови пациентов при эритемной форме ИКБ, протекающей на фоне их инфицирования возбудителем ГАЧ, и подтверждает активный инфекционный процесс у пациентов с локализованной стадией ИКБ (моноинфекция и микст-инфекция с ГАЧ).

Частота выявления IgM, IgG и ДНК боррелий на диссеминированной стадии ИКБ. На этой стадии заболевания (моноинфекция ИКБ и коинфекция с ГАЧ) частота выявления антител и ДНК методами ИФА-Омникс и ПЦР составила $47 \pm 11\%$ и $42 \pm 11\%$ соответственно. Показатель чувствительности ФОСФАН ($69,2 \pm 9,7\%$) был достоверно выше (табл. 1). На первой неделе от начала заболевания ИКБ положительные результаты регистрировали чаще в ФОСФАН ($58 \pm 32\%$), чем в ПЦР и ИФА, хотя различия не достигали статистически значимого уровня. Максимальная частота выявления антител и ДНК (примерно в 70% проб) наблюдалась на 2 – 4 неделе. Начиная с 5 недели, доля положительных проб в ИФА и ПЦР существенно снижалась, а в ФОСФАН оставалась на высоком уровне.

Совокупность полученных серологических результатов и данных ПЦР подтверждает факт диссеминации боррелий в крови пациентов с безэритемной формой ИКБ, что проявляется серьезными органами и системными поражениями и более тяжелым клиническим течением заболевания [12].

Диагностическая эффективность ФОСФАН и ПЦР при эритемной форме ИКБ. Как известно, на локализованной стадии ИКБ серологические методы и ПЦР не играют существенной роли в подтверждении клинического диагноза, который основывается на наличии типичной мигрирующей эритемы (МЭ) [1, 2]. Однако в сомнительных случаях (нетипичные форма, внешний вид или размер МЭ) использование лабораторных методов позволяет повысить уверенность клинициста в правильной постановке диагноза. В связи с этим мы оценили чувствительность методов ФОСФАН и ПЦР и целесообразность их совместного применения при эритемной форме ИКБ.

Из 93 пациентов с локализованной стадией моноинфекции ИКБ у 12 ($12,9 \pm 6,8\%$) обнаружена ДНК боррелий, у 67 ($72 \pm 9,7\%$) – специфические

IgM и (или) IgG к пептиду С6. У 11 из 12 ($91,7 \pm 19,8\%$) пациентов положительный результат ПЦР подтвержден в ФОСФАН (табл. 2). Положительные результаты двух методов у большинства пациентов (7 из 11) регистрировались на одних и тех же сроках от начала заболевания ИКБ, у 2 – раньше в ПЦР, у 2 – позже в ПЦР, чем в ФОСФАН. У одного пациента с положительным результатом ПЦР антиборрелиозные антитела не были выявлены ни в одном серологическом тесте (исследованы 2 сыворотки, собранные на 5 и 13 день от начала заболевания). У 56 из 81 ($69,1 \pm 10,7\%$) пациентов с отрицательным результатом ПЦР выявлены антитела в ФОСФАН (см. табл. 2). Из них у 6 человек обнаруживались только С6-IgM, в том числе у 2 пациентов в сочетании с IgM к OspC или VlsE.

Из 30 пациентов с локализованной стадией ИКБ, сочетавшейся с ГАЧ, положительный результат ПЦР установлен у 20 ($66,7 \pm 17,6\%$), ФОСФАН – у 29 ($96,7 \pm 8,1\%$) больных. Положительная реакция в ФОСФАН обнаруживалась у всех пациентов с положительным результатом ПЦР, а также у 9 из 10 больных с отрицательным результатом ПЦР (см. табл. 2). Положительные результаты двух методов определены на одних и тех же сроках болезни у 16 из 20 больных, у 4 больных – позже в ПЦР, чем в ФОСФАН.

Таким образом, на локализованной стадии ИКБ (моноинфекция и микст-инфекция с ГАЧ) ФОСФАН обеспечивает серологическое подтверждение заболевания у 96 из 123, то есть у $78 \pm 7,7\%$ пациентов, тогда как показатели ПЦР существенно ниже (у 32 или $26 \pm 8,2\%$ больных). Применение ПЦР в дополнение к ФОСФАН позволило подтвердить клинический диагноз лишь у одного пациента, серонегативного по данным всех серологических тестов, в том числе ФОСФАН.

Диагностическая эффективность ФОСФАН при подтверждающей диагностике безэритемной формы ИКБ. Группа пациентов ($n = 32$) с диссеминированной стадией ИКБ (моноинфекция и коинфекция с ГАЧ) была сформирована на основе совокупности анамнестических и клинических признаков, характерных для безэритемной формы [13, 14], с подтверждением клинического диагноза методом ПЦР и в ИФА-Омникс. Из числа этих пациентов у 23 выявлена ДНК *B. burgdorferi sensu lato* в ПЦР (в том числе у 21 больного в сочетании с положительным результатом ИФА); у 8 – только антитела в ИФА; у одного пациента (с поражением опорно-двигательного аппарата и сердечно-сосудистой системы) результаты обоих методов были отрицательными.

С учетом высокой вероятности выявления IgM в отсутствие IgG на диссеминированной стадии ИКБ [9], использовали 2 варианта оценки положительных результатов ФОСФАН. В первом случае учитывали обнаружение IgM и (или) IgG при тестировании с пептидом С6 (такой подход был применен для оценки результатов обследования пациентов с локализованной стадией ИКБ). Во втором случае дополнительно к первому варианту учитывали по-

Таблица 2.

Диагностическая эффективность методов ФОСФАН и ПЦР при подтверждении клинического диагноза ИКБ (приведено число положительных [+] или отрицательных [-] результатов обследования 155 пациентов)

Группа больных ИКБ	Результат ФОСФАН	Результат ПЦР		Всего
		+	-	
ИКБ1	+	11	56	67
	-	1	25	26
	Всего	12	81	93
ИКБ1 + ГАЧ	+	20	9	29
	-	0	1	1
	Всего	20	10	30
ИКБ2	+	18	7*	25
	-	5	2	7
	Всего	23	9	32
ИКБ2	+	21**	8**. **	29
	-	2	1	3
	Всего	23	9	32
	Итого	55	100	155

Примечание: *положительные результаты тестирования в ИФА-Омникс; **положительные результаты ФОСФАН (обнаружение IgM, IgG с пептидом С6 и IgM с рекомбинантным белком VIsE).

положительный результат выявления IgM в реакции с рекомбинантным белком VIsE (этот белок наряду с пептидом С6 входит в состав мультиплексного теста ФОСФАН).

При первом подходе положительные результаты ФОСФАН были зарегистрированы у 25 из 32 (78,1 ± 15,9%) больных, в том числе у 18 пациентов, положительных по данным ПЦР и ИФА, и у 7 пациентов, положительных только в ИФА (табл. 2).

При использовании второго подхода положительная реакция в ФОСФАН зарегистрирована у 29 из 32 (90,6 ± 11,7%) больных, в том числе у 21 пациента с положительным результатом ПЦР и ИФА, и у 8 человек, положительных только в ИФА (см. табл. 2). Положительные реакции в ФОСФАН и ПЦР у большинства пациентов (13 из 21) определялись на одних и тех же сроках болезни, у 1 – раньше в ПЦР, у 7 – позже в ПЦР, чем в ФОСФАН. Двое из 23 пациентов с положительным результатом ПЦР были серонегативными по данным ФОСФАН и ИФА (табл. 2).

Таким образом, на диссеминированной стадии ИКБ (моноинфекция и микст-инфекция с ГАЧ) ФОСФАН обеспечивает серологическое подтверждение

заболевания у 21 из 23 (91,3 ± 13,3%) пациентов, включенных в эту группу на основании положительных результатов ПЦР и ИФА, и у всех пациентов, положительных только по данным ИФА. Применение ПЦР позволило подтвердить клинический диагноз безэритемной формы ИКБ у двух больных, серонегативных в ИФА и ФОСФАН. У одного пациента этой группы (с характерной для безэритемной формы симптоматикой) результаты тестирования всеми методами, в том числе ФОСФАН, были отрицательными.

Выводы

1. ФОСФАН обеспечивает эффективное серологическое подтверждение ИКБ на локализованной стадии заболевания (моноинфекция и коинфекция с ГАЧ) благодаря достоверно более высокой чувствительности по сравнению с ИФА и ПЦР, в том числе на ранних сроках болезни. Применение ФОСФАН позволило подтвердить клинический диагноз эритемной формы ИКБ почти у 80% пациентов, что существенно выше показателя ПЦР (26 ± 8,2%).
2. Частота выявления положительных проб в ФОСФАН на диссеминированной стадии ИКБ

(моноинфекция и коинфекция с ГАЧ) сопоставима с показателями ПЦР и ИФА. Главное преимущество ФОСФАН по сравнению с этими методами – возможность более раннего выявления специфических иммуноглобулинов у значительного числа больных.

3. Серологическое подтверждение безэритемной формы ИКБ методом ФОСФАН должно базироваться на выявлении IgM при тестировании сывороток с белком VlsE (дополнительно к определению IgM и IgG с пептидом С6). Такой подход позволяет подтвердить диагноз у 29 из 31 (93,5 ± 9%) пациента, отнесенного к этой группе.
4. В целом ФОСФАН обеспечил серологическое подтверждение заболевания ИКБ у 52 из 55 (94,5±6,2%) больных, в крови которых была обнаружена ДНК боррелий.
5. Максимальная частота выявления положительных проб методами ФОСФАН, ИФА и ПЦР наблюдалась в основном на 2 – 4-й неделе от начала заболевания или на 22 – 35-й день после укуса клеща.

6. Мультиплексный иммуночиповый анализ ФОСФАН – это перспективный подход к серологическому подтверждению ИКБ. Применение ПЦР (в дополнение к ФОСФАН) целесообразно в определенные сроки (не позднее 2 – 3 недели от начала заболевания) в случаях, когда необходимо уточнить диагноз у серонегативных больных, имеющих клинические признаки, характерные для безэритемной формы, или нетипичные кожные проявления, вызывающие сомнения при постановке диагноза эритемной формы ИКБ.

Авторы выражают глубокую благодарность специалистам ФГУП «ГосНИИБП» ФМБА РФ (Москва) Т.А. Быченковой, Н.И. Бекман, Т.А. Канаевой, принимавшим участие в разных этапах исследований, а также сотрудникам Пермской краевой клинической инфекционной больницы № 1 и кафедры инфекционных болезней Пермской государственной медицинской академии В.И. Фризену, Н.Н. Воробьевой и В.Ю. Тетерину за предоставленные пробы крови клинически охарактеризованных пациентов.

Литература

1. Aguero-Rosenfeld M.E., Wang G., Schwartz I., Wormser G.P. Diagnosis of Lyme borreliosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; 18: 484 – 509.
2. Wilske B., Fingerle V., Schulte-Spechtel U. Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS immunology and medical microbiology.* 2007; 49: 13 – 21.
3. Тетерин В.Ю., Коренберг Э.И., Нефедова В.В., Воробьева Н.Н., Фризен В.И. Результаты применения метода полимеразной цепной реакции для лабораторного подтверждения иксодовых клещевых боррелиозов. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика.* 2010; 5: 35 – 40.
4. Коренберг Э.И., Помелова В.Г., Осин Н.С. Природно-очаговые инфекции, передающиеся иксодовыми клещами. Москва: Наука; 2013.
5. Нефедова В.В., Тетерин В.Ю., Коренберг Э.И., Горелова Н.Б., Воробьева Н.Н., Фризен В.И. Изоляция возбудителя иксодового клещевого боррелиоза из крови больных. *Журнал микробиол. эпидемиол. иммунобиол.* 2009; 1: 63 – 66.
6. Тетерин В.Ю. Оптимизация лабораторной диагностики и клинические особенности иксодовых клещевых боррелиозов, гранулоцитарного анаплазмоза человека: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Москва; 2012.
7. Osin N.S., Pomelova V.G. Multi-array immunophosphorescence technology for the detection of pathogens. In: *Frontiers in research. National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH.* (Eds.: V.St. Georgiev, K.A. Western and J.J. McGowan). Totowa, NJ: Humana Press; 2008: 233 – 240.
8. Помелова В.Г., Коренберг Э.И., Осин Н.С., Быченкова Т.А., Бекман Н.И., Канаева Т.А. и др. Применение фосфоресцентных иммуночипов для серологической диагностики иксодовых клещевых боррелиозов. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика.* 2010; 1: 22 – 29.
9. Помелова В.Г., Коренберг Э.И., Кузнецова Т.И., Осин Н.С. Особенности формирования гуморального ответа в остром периоде ИКБ (по результатам мультиплексного иммуночипового анализа). *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика.* 2015; 1 (80): 20 – 27.
10. Liang F.T., Steere A.C., Marques A.R., Johnson B.J.B., Miller J.N., Philipp M.T. Sensitive and specific serodiagnosis of Lyme disease by enzyme-linked immunosorbent assay with a peptide based on an immunodominant conserved region of *Borrelia burgdorferi* VlsE. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37: 3990 – 3996.
11. Philipp M.T., Bowers L.C., Fawcett P.T., Jacobs M.B., Liang F.T., Marcues A.R. et al. Antibody response to IR6, a conserved immunodominant region of the VlsE lipoprotein, wanes rapidly after antibiotic treatment of *Borrelia burgdorferi* infection in experimental animals and in humans. *J. Infect. Dis.* 2001; 184: 870 – 878.
12. Тетерин В.Ю., Коренберг Э.И., Нефедова В.В., Воробьева Н.Н., Фризен В.И., Помелова В.Г. и др. Клинико-лабораторная диагностика инфекций, передающихся иксодовыми клещами в Пермском крае. *Эпидемиология и инфекционные болезни.* 2013; 4: 11 – 15.
13. Воробьева Н.Н. Клиника, лечение и профилактика иксодовых клещевых боррелиозов. Пермь: Урал-Пресс, 1998: 136.
14. Воробьева Н.Н., Сумливая О.Н. Клинические варианты иксодовых клещевых боррелиозов в остром периоде заболевания. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни.* 2003; 4: 3 – 7.

References

1. Aguero-Rosenfeld M.E., Wang G., Schwartz I., Wormser G.P. Diagnosis of Lyme borreliosis. // *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; 18: 484 – 509.
2. Wilske B., Fingerle V., Schulte-Spechtel U. Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS immunology and medical microbiology.* 2007; 49: 13 – 21.
3. Teterin V.Yu., Korenberg E.I., Nefedova V.V., Vorob'eva N.N., Frizen V.I. Results of polymerase chain reaction application for laboratory confirmation of ixodid tick-borne. *Epidemiology and Vaccine Prophylactics.* 2010; 5: 35 – 40 (in Russian).
4. Korenberg E.I., Pomelova V.G., Osin N.S. Infections with natural focality transmitted by ixodid ticks. Moscow: Nauka; 2013 (in Russian).
5. Nefedova V.V., Teterin V.Yu., Korenberg E.I., Gorelova N.B., Vorob'eva N.N., Frizen V.I. Isolation of ixodid tick-borne borreliosis agent from patient blood. *Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2009; 1: 63 – 66 (in Russian).
6. Teterin V.Yu. Optimization of laboratory diagnosis and clinical features of ixodid tick-borne borrelioses and human granulocytic anaplasmosis: PhD of med. sci. diss. Moscow; 2012 (in Russian).
7. Osin N.S., Pomelova V.G. Multi-array immunophosphorescence technology for the detection of pathogens. In: *Frontiers in research. National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH.* (Eds.: V.St. Georgiev, K.A. Western and J.J. McGowan). Totowa, NJ: Humana Press; 2008: 233 – 240.
8. Pomelova V.G., Korenberg E.I., Osin N.S., Bychenkova N.A., Bekman N.I., Kanaeva T.A. et al. The use of microarray-based phosphorescent immunoassay tests for serologic diagnosis of ixodid tick-borne borrelioses. *Epidemiology and Vaccine Prophylactics.* 2010; 1: 22 – 29 (in Russian).
9. Pomelova V.G., Korenberg E.I., Kuznetsova T.I., Osin N.S. The features of humoral immune responses development in the acute period of ixodid tick-borne borrelioses (according to the results of multiplex microarray immunoassay test). *Epidemiology and Vaccine Prevention.* 2015; 1 (80): 20 – 27 (in Russian).
10. Liang F.T., Steere A.C., Marques A.R., Johnson B.J.B., Miller J.N., Philipp M.T. Sensitive and specific serodiagnosis of Lyme disease by enzyme-linked immunosorbent assay with a peptide based on an immunodominant conserved region of *Borrelia burgdorferi* VlsE. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37: 3990 – 3996.
11. Philipp M.T., Bowers L.C., Fawcett P.T., Jacobs M.B., Liang F.T., Marcues A.R. et al. Antibody response to IR6, a conserved immunodominant region of the VlsE lipoprotein, wanes rapidly after antibiotic treatment of *Borrelia burgdorferi* infection in experimental animals and in humans. *J. Infect. Dis.* 2001; 184: 870 – 878.
12. Teterin V.Yu., Korenberg E.I., Nefedova V.V., Vorob'ova N.N., Frizen V.I., Pomelova V.G. et al. Clinical and laboratory diagnosis of infections transmitted by ixodid ticks in Perm region. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni.* 2013; 4: 11 – 15 (in Russian).
13. Vorob'ova N.N. Clinical manifestations, treatment, and prophylactics of ixodid tick-borne borrelioses. Perm: Ural Press; 1998 (in Russian).
14. Vorob'ova N.N., Syumlivaya O.N. Clinical variants of ixodid tick-borne borrelioses in acute period of disease. *Medical Parasitology and Parasitic Diseases.* 2003; 4: 3 – 7 (in Russian).