

Особенности формирования гуморального иммунного ответа в остром периоде иксодового клещевого боррелиоза (По результатам мультиплексного иммуночипового анализа)

В.Г. Помелова¹ (v.pomelova@immunoscreen.ru),
Э.И. Коренберг², Т.И. Кузнецова³, Н.С. Осин⁴

¹ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт биологического приборостроения» ФМБА России, Москва

²ФГБУ «ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва

³ГБУЗ Пермского края «Пермская краевая клиническая инфекционная больница»

⁴ЗАО «Иммюноскрин», Москва

Резюме

Изучены особенности формирования IgM и IgG к антигенам боррелий C6, OspC и VlsE у 155 больных с локализованной и диссеминированной стадиями заболевания иксодовыми клещевыми боррелиозами (ИКБ), в том числе при микст-инфекции с гранулоцитарным анаплазмозом человека (ГАЧ). Сыворотки крови пациентов (n = 373) исследованы методом мультиплексного иммуночипового анализа ФОСФАН™. На локализованной стадии болезни чаще всего выявляли IgG к пептиду C6 из *B. burgdorferi*; это отмечено для всех сроков после укуса клеща, кроме первой недели. Определение суммарных IgM и IgG к этому пептиду несколько повышало (хотя недостаточно) частоту выявления положительных проб. OspC-IgM и VlsE-IgM обнаруживались только в сыворотках крови пациентов, у которых были также выявлены IgM и IgG к пептиду C6, поэтому определение IgM к рекомбинантным белкам не вносило существенного вклада в показатель общей чувствительности тестирования. При микст-инфекции с ГАЧ положительные пробы с IgM и IgG обнаруживали достоверно чаще, чем при моноинфекции ИКБ ($p < 0,05$). На диссеминированной стадии болезни доля положительных проб с IgM к любому из трех антигенов боррелий была сопоставима или выше, чем доля проб с C6-IgG, при этом у значительной части пациентов определялись только IgM; это обуславливает необходимость использования альтернативных методов (например, ПЦР) для исключения ложноположительных результатов.

Ключевые слова: иксодовые клещевые боррелиозы, локализованная и диссеминированная стадии заболевания, микст-инфекция с гранулоцитарным анаплазмозом человека, гуморальный иммунитет, мультиплексный иммуночиповый анализ ФОСФАН™, пептид C6, рекомбинантные белки OspC и VlsE

The Features of a Humoral Immune Response Development during the Acute Phase of ixodes Tick-Borne Borreliosis (Based on Multiplex Analysis with the Immunochip)

V.G. Pomelova¹ (v.pomelova@immunoscreen.ru), E.I. Korenberg², T.I. Kuznetsova³, N.S. Osin⁴

¹ Federal State Unitary Enterprise Institute for Biological Instrumentation of the Federal Biomedical Agency, Moscow

² Federal 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

³ State Budgetary Healthcare Institution Perm' Regional Clinical Infectious Diseases Hospital

⁴ Closed Joint Stock Company «Immunoskrin», Moscow

Abstract

The features of development of IgM or IgG immune responses to *Borrelia* antigens (C6, OspC and VlsE) were studied in 155 patients with localized and disseminated stages of disease with Ixodid Tick-borne Borrelioses (ITBB), the cases of mixed infection with ITBB and human granulocytic anaplasmosis (HGA) including. Patient sera (n = 373) were examined by a multiplex microarray immunoassay test (PHOSPHAN™). At the localized stage of the disease, a positive PHOSPHAN reaction with C6 from *B. burgdorferi* was observed significantly more frequently in tests for IgG than for IgM at almost all times after tick bite, except for the first week. The frequency of positive samples in tests for both IgM and IgG was higher than for IgG alone, although the difference lacked statistical significance. Positive reactions with OspC or VlsE were observed only in the samples from patients that were also positive for IgM and/or IgG to C6. Therefore, additional detection of IgM to recombinant proteins did not improve significantly the overall sensitivity of the latter PHOSPHAN variant. As compared with ITBB mono-infection, the frequency of positive samples in patients with mixed ITBB + HGA infection was significantly higher ($p < 0.05$). At the disseminated stage of the disease, the proportion of positive reactions with any of *Borrelia* antigens for IgM was comparable or higher than for C6-IgG that resulted in a substantial number of patients with negative reactions for IgG; this necessitates the use of alternative methods (e.g., PCR) to exclude false-positive serologic results.

Key words: ixodid tick-borne borrelioses (ITBB), localized and disseminated stages of disease with ITBB, coinfection with ITBB and HGA, multiplex microarray immunoassay PHOSPHAN™, IgM and IgG to *Borrelia* antigens, C6 peptide, recombinant proteins OspC and VlsE

Введение

В настоящее время серологические методы рассматриваются как основные для лабораторного подтверждения заболевания иксодовыми клещевыми боррелиозами (ИКБ) на всех стадиях после первых недель от его начала [1 – 3]. Для повышения чувствительности и специфичности традиционных серологических тестов используют рекомбинантные и пептидные антигены боррелий [1, 2] или их комбинации [4, 5]. Разработан новый перспективный подход – мультиплексный мультиантигенный анализ на иммуночипах [6 – 8]. Он позволяет оценить спектр антител при анализе одной и той же пробы сыворотки, в том числе при микст-инфекции [6], снижает стоимость и трудоемкость работы.

Успех серологических исследований в значительной степени зависит от правильного подбора антигенов боррелий в составе диагностического теста. Для раннего выявления антиборрелиозных антител в остром периоде ИКБ наиболее перспективны пептид С6, аминокислотная последовательность которого соответствует консервативной иммунодоминантной области IR6 поверхностного белка VlsE *Borrelia burgdorferi sensu stricto* [9], а также рекомбинантные белки OspC и VlsE [10]. Эти антигены появляются у млекопитающих вскоре после заражения боррелиями [1, 2]. В структуре гуморального иммунного ответа к С6 даже на очень ранних сроках заболевания доминируют IgG [9], VlsE активно выявляет антитела обоих классов [11, 12], а OspC генерирует в основном IgM [4]. Тест на основе пептида С6 рассматривается как самостоятельный, представляющий собой потенциальную альтернативу процедуре двухступенчатого тестирования при серодиагностике болезни Лайма в США и Европе [13 – 15]. При этом в Евразии рекомендуют использовать пептид С6 из *B. burgdorferi sensu stricto* в комбинации с пептидами, соответствующими аминокислотной последовательности иммунодоминантных доменов IR₆ европейских генов боррелий [16, 17], с включением рекомбинантных белков, прежде всего OspC и VlsE [12, 15].

Ранее нами на основе технологии ФОСФАН™ [18] (ЗАО «Иммуноскрин», Москва) и пептида С6 из *B. burgdorferi sensu stricto* был разработан иммуночип, который продемонстрировал чувствительность и специфичность, сопоставимые с американской тест-системой С6 ELISA Immunitics [6], и превосходил по этим показателям отечественный иммуноферментный (ИФА) тест [19]. Включение в состав иммуночипа других антигенов боррелий (дополнительно к пептиду С6) не оказывало статистически достоверного влияния на показатель общей чувствительности при обследовании пациентов с эритемной формой ИКБ [6]. Нельзя, однако, исключить, что при других вариантах клинического течения ИКБ (например, в случае сочетанной инфекции или при безэритемной форме) композиция антигенов боррелий в составе мультиплексного теста может быть иной.

Несмотря на интенсивное использование С6, OspC и VlsE в составе коммерческих тест-систем, данные о сроках появления и уровне накопления антител к каждому из них ограничены и получены в основном на моделях животных при их экспериментальном заражении [9, 20 и др.]. За редким исключением [21], практически не изучены особенности формирования гуморального иммунного ответа к этим антигенам в остром периоде ИКБ, и в частности при микст-инфекции. Вместе с тем такие данные не только представляют интерес для понимания особенностей формирования гуморального иммунитета при ИКБ, но и остро необходимы в практической работе для выбора рациональной композиции антигенов и обоснования оптимальных сроков применения серологических тестов.

Цель работы – изучить особенности формирования иммуноглобулинов М и G к пептиду С6 и рекомбинантным белкам OspC и VlsE в остром периоде ИКБ при локализованной и диссеминированной стадии заболевания, в том числе при сочетанной инфекции с гранулоцитарным анаплазмозом человека (ГАЧ), а также обосновать целесообразность включения этих антигенов в состав мультиплексного теста на основе ФОСФАН™.

Материалы и методы

Сыворотки крови больных ИКБ. Сыворотки крови (n = 373) были собраны в Пермском крае в эпидемический сезон (с мая по сентябрь) в 2010 году от 155 больных с клиническим диагнозом ИКБ. Все пациенты отмечали присасывание клеща до начала заболевания. Средний возраст пациентов составил от 50 до 60 лет. От 139 (89,7%) пациентов получено от двух до пяти проб сывороток на разных сроках от начала заболевания (табл. 1).

Для изучения особенностей формирования гуморального иммунного ответа в остром периоде ИКБ на локализованной и диссеминированной стадиях заболевания, в том числе при коинфекции с ГАЧ, пациенты были разделены на четыре группы. Группа 1 – ИКБ 1 и группа 2 – ИКБ 1 + ГАЧ состояли соответственно из 93 (моноинфекция) и 30 (в сочетании с ГАЧ) больных с локализованной стадией ИКБ. Наличие микст-инфекции подтверждено выявлением ДНК возбудителя ГАЧ в крови пациентов методом ПЦР. Клинический диагноз боррелиоза (эритемная форма) основывался на наличии типичной мигрирующей эритемы (МЭ) в сочетании (у части больных) с общеинфекционным синдромом. У 12 (12,9%) пациентов с моноинфекцией и у 20 (66,7%) пациентов с микст-инфекцией клинический диагноз ИКБ подтвержден выявлением ДНК *B. burgdorferi sensu lato* методом ПЦР. Число мужчин и женщин было примерно одинаковым с некоторым преобладанием женщин. У большинства больных наблюдалось легкое течение заболевания, хотя при коинфекции с ГАЧ доля больных со среднетяжелым течением болезни была

Таблица 1
Клинико-диагностическая характеристика пациентов

Показатель	ИКБ, локализованная стадия		ИКБ, диссеминированная стадия	
	моноинфекция ИКБ (ИКБ 1)	коинфекция с ГАЧ (ИКБ 1 + ГАЧ)	моноинфекция ИКБ (ИКБ 2)	коинфекция с ГАЧ (ИКБ 2 + ГАЧ)
Число человек (сывороток)	93 (217)	30 (78)	9 (23)	23 (55)
Возрастной интервал, лет средний ± СКО	23 – 84 59 ± 4	32 – 81 61 ± 13	16 – 76 51 ± 13	23 – 81 54 ± 13
Пол: мужчин/женщин	41/52	14/16	6/3	18/5
Течение заболевания: легкое/среднетяжелое	71/22	18/12	1/8	1/22
Инкубационный период ¹ (дни): медиана [95% ДИ]	1 – 47 9 [4 – 10]	2 – 34 11 [9 – 14]	2 – 23 15 [5 – 21]	3 – 47 15 [9 – 19]
Срок поступления в стационар ² (дни): медиана [95% ДИ]	1 – 36 4 [3 – 5]	1 – 19 8 [4 – 9]	1 – 12 3 [2 – 8]	2 – 62 7 [3 – 16]
Продолжительность острого инфекционного процесса ³ (дни): медиана [95% ДИ]	3 – 59 15 [12 – 15]*	9 – 37 19 [15 – 22]*	2 – 25 19 [8 – 24]	7 – 76 21 [17 – 26]*
Число пациентов, у которых сыворотки взяты:				
1 раз	13	1	1	1
2 раза	37	12	3	13
3 раза	42	15	4	8
4 раза	1	2	1	1

Примечание: СКО – среднееквадратичное отклонение от среднего значения; ¹соответствует сроку от укуса клеща до начала заболевания ИКБ; ²соответствует сроку поступления в стационар и взятию сыворотки на исследование после начала заболевания ИКБ; ³соответствует сроку от укуса клеща до взятия сыворотки на исследование; *достоверность различий между группами по данному показателю ($p \leq 0,05$).

несколько выше, чем при моноинфекции. Длительность инкубационного периода (от укуса клеща до начала заболевания) составила в среднем 9 – 11 дней. Средняя продолжительность периода от укуса клеща до взятия первой сыворотки для исследования и начала лечения была достоверно меньше при моноинфекции, чем при микст-инфекции с ГАЧ ($p = 0,05$), по-видимому, вследствие более позднего поступления в стационар пациентов второй из этих групп (см. табл. 1).

Группа 3 – ИКБ 2 и группа 4 – ИКБ 2 + ГАЧ состояли соответственно из 9 (моноинфекция) и 23 (в сочетании с ГАЧ) больных с диссеминированной стадией ИКБ. Клинический диагноз боррелиоза основывался на совокупности анамнестических и клинических признаков, характерных для безэритемной формы [22, 23]. У 6 (66,7%) пациентов с моноинфекцией и у 17 (73,9%) пациентов с микст-инфекцией клинический диагноз подтвержден выявлением ДНК *B. burgdorferi sensu lato* методом ПЦР; у остальных пациентов этих групп – серологически в ИФА на основе рекомбинантных белков боррелий (компания «Омникс», Санкт-Петербург) при отрицательном результате ИФА и ПЦР в отношении клещевого энцефалита. Число мужчин было в 2 – 4 раза больше, чем женщин. У подавляющего большинства больных отмечено среднетяжелое те-

чение болезни. Инкубационный период был более продолжительным (в среднем 15 дней), чем при локализованной стадии ИКБ, а длительность острой инфекции соответствовала продолжительности этой формы у пациентов с эритемной формой ИКБ в сочетании с ГАЧ (см. табл. 1).

Сыворотки и результаты их исследования методами ИФА (в тест-системе компании «Омникс») 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.

Сыворотки доноров. Для оценки специфичности серологических исследований в работе использовали сыворотки от 197-ми здоровых доноров крови из того же эндемического региона. Все сыворотки до исследования хранили в виде аликвот при температуре -20°C .

Выполнение ИФА. Пробы от больных с локализованной стадией ИКБ протестированы на наличие общих IgM и IgG в тест-системе C6 ELISA Immunetics (Immunetics Inc., США) в соответствии с инструкцией производителя.

Пептидные и рекомбинантные антигены. Пептид C6-VlsE из *B. burgdorferi sensu stricto* B31 лю-

безно предоставлен Б. Джонсон (Barbara Johnson, CDC, Fort Collins, США). Каждый из белков OspC или VlsE (получены из компании «Омникс») представлял собой мозаичный рекомбинантный антиген боррелий трех геновидов (*B. burgdorferi sensu stricto* B31, *B. garinii* Ip90 и *B. afzelii* ACA-1).

Выполнение мультиплексного теста. ФОСФАН – это твердофазный сэндвич-иммуноанализ, который проводится в лунках стандартных полистироловых микропланшетов (Maxisorb, Nunc, Дания) аналогично ИФА [18]. На дне лунок микроплшета с помощью наноплоттера для контактной печати (ЗАО «Иммуноскрин») напечатаны микрозоны (диаметром 0,7 мм каждая) с пептидом С6 (для определения IgM и IgG) и белками OspC или VlsE (для определения IgM). Этапы выполнения иммуноанализа подробно описаны ранее [6]. Результат считали положительным (антитела выявлены), если значение коэффициента позитивности ($K_{\text{поз.}}$) было ≥ 1 .

Расчет частоты сероконверсии. Факт сероконверсии устанавливали на основе появления IgM и/или IgG и/или не менее чем двукратного нарастания (или убывания) значений $K_{\text{поз.}}$ в парных сыворотках.

Статистическая обработка результатов. Выявление статистически значимых различий выборок по качественным показателям (сравнение долей) проводили с помощью точного двустороннего критерия Фишера для уровня статистической значимости $p \leq 0,05$ и при доверительном интервале медианы (ДИ) 95%.

Результаты и обсуждение

Частота выявления IgM и IgG при локализованной стадии ИКБ. При локализованной стадии ИКБ чаще всего выявляли IgG к пептиду С6: примерно в 50% проб при моноинфекции и более чем

в 80% при коинфекции с ГАЧ. IgM обнаруживали существенно реже (табл. 2) и, как правило, в тех же пробах, в которых выявлены IgG. Вследствие этого определение IgM к любому из трех антигенов в дополнение к С6-IgG не приводило к статистически достоверному повышению показателя общей чувствительности, что согласуется с полученными ранее данными [6, 24].

При микст-инфекции с ГАЧ частота выявления положительных проб с IgM или IgG была достоверно выше ($p < 0,05$), чем при моноинфекции ИКБ (табл. 2). Эти результаты (в совокупности с данными ПЦР о выявлении ДНК *B. burgdorferi sensu lato* в крови почти 70% больных) свидетельствуют о диссеминации и накоплении боррелий в крови пациента при эритемной форме ИКБ, протекающей на фоне внутриклеточной инфекции возбудителем ГАЧ. У больных с локализованной стадией моноинфекции ИКБ и положительным результатом ПЦР, то есть при наличии признаков диссеминации боррелий, также отмечено достоверное повышение числа положительных проб по сравнению с пациентами, у которых признаков диссеминации не установлено. Однако частота выявления антител в этих случаях была ниже значений, регистрируемых при микст-инфекции с ГАЧ: от 16 до 34% для IgM и около 66% для IgG (исследованы 32 сыворотки от 12 больных).

Значительная часть положительных результатов регистрировалась при анализе первых сывороток крови, взятой до начала лечения. В первые дни после начала антибиотикотерапии число положительных проб с IgM и IgG, как правило, существенно возрастало (см. табл. 2). Частота сероконверсии составила 53 – 62% и 70 – 86% для С6-IgM и OspC-IgM соответственно, с максимальными показателями 89 – 94% для С6-IgG и 100% для VlsE-IgM.

Таблица 2.

Частота выявления иммуноглобулинов М и G к антигенам боррелий в сыворотках обследованных пациентов (по результатам мультиплексного анализа)

Группа больных ИКБ	Число сывороток	Число (%) положительных сывороток с IgM и/или IgG к антигенам боррелий									
		OspC-IgM		VlsE-IgM		С6-IgM		С6-IgG		С6 IgM/IgG	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
ИКБ 1, в том числе: до начала лечения после начала лечения	217	41	18,9*	19	8,8*	33	15,2*	105	48,4*	117	53,9*
	93	13	14,0	1	1,1	14	15,1	28	30,1	35	37,6
	124	28	22,6	18	14,5	19	15,3	77	62,1	82	66,1
ИКБ 1 + ГАЧ, в том числе: до начала лечения после начала лечения	78	37	47,4*	38	48,7*	41	52,6*	65	83,3*	69	88,5*
	30	9	30,0	11	36,7	14	46,7	20	66,7	24	80
	48	28	58,3	27	56,3	27	56,3	45	93,8	45	93,8
ИКБ 2, в том числе: до начала лечения после начала лечения	23	3	13,0	10	43,5	11	47,8	10	43,5	17	73,9
	9	1	11,1	3	33,3	3	33,3	3	33,3	6	66,7
	14	2	14,3	7	50,0	8	57,1	7	50,0	11	78,6
ИКБ 2 + ГАЧ, в том числе: до начала лечения после начала лечения	55	30	54,5	32	58,2	27	49,1	31	56,4	35	63,6
	22	11	50,0	9	40,9	10	45,5	11	50,0	14	63,6
	33	19	57,6	23	69,7	17	51,5	20	60,6	21	63,6

Примечание: обозначение групп пациентов см. таблицу 1;

*достоверность различий между группами ИКБ 1 и ИКБ 1 + ГАЧ с данным антигеном ($p \leq 0,05$).

Совокупность этих результатов свидетельствует об активном инфекционном процессе у пациентов с локализованной стадией ИКБ.

Частота выявления IgM и IgG на диссеминированной стадии ИКБ. В диссеминированной стадии ИКБ (моноинфекция и коинфекция с ГАЧ) частота выявления IgM к любому из трех антигенов и IgG к пептиду С6 была примерно одинакова (см. табл. 2), при этом у значительной части пациентов определялись только IgM. Известно, однако, что, если IgG не появляются на более поздних сроках заболевания, выявление IgM, скорее всего, можно считать ложноположительным результатом [1, 2], который, в частности, может быть обусловлен индукцией полиреактивных IgM В1-клетками при внутриклеточной бактериальной инфекции [25]. В таких сомнительных случаях ведущая роль в подтверждении клинического диагноза безэритемной формы ИКБ должна, по-видимому, принадлежать ПЦР.

Дополнительный аргумент в пользу альтернативных подтверждающих методов – низкие показатели сероконверсии, выявляемые у больных с диссеминированной стадией ИКБ: от 33 до 43% для С6-IgM, OspC-IgM или С6-IgG с максимальным показателем около 60% – для VisE-IgM. Вероятно, это объясняется тем, что в течение более продолжительного периода острой инфекции (см. табл. 1) значительная часть антител была синтезирована до начала лечения (см. табл. 2).

Частота выявления IgM и IgG на разных сроках после укуса клеща. На локализованной стадии ИКБ у подавляющего большинства пациентов

IgG к пептиду С6 обнаруживали чаще, чем IgM; это было справедливо для всех сроков после укуса клеща, кроме первой недели (рис. 1А, Б).

При моноинфекции ИКБ С6-IgG и С6-IgM регистрировали примерно в 20% сывороток уже на первой неделе с максимумом (для IgG) около 80% на 22 – 35-й день; IgM определяли в течение всего периода наблюдений не более чем в 20% проб (см. рис.1 А, Б). При коинфекции с ГАЧ IgG и IgM к этому пептиду выявляли чаще, с максимумом более 90% и примерно 70% соответственно. При анализе первых порций сывороток, полученных начиная со второй недели от укуса, IgG и IgM были обнаружены примерно в 70 и 30% проб соответственно (см. рис. 1 А, Б) (отсутствие «ранних» проб при коинфекции с ГАЧ объясняется более поздним поступлением пациентов этой группы в стационар (см. табл. 1)). Определение IgM в дополнение к IgG повышало чувствительность анализа ФОСФАН, особенно на ранних сроках локализованной стадии заболевания (см. рис. 2А, Б), хотя эти различия не достигали статистически значимого уровня.

IgM к OspC и VisE при моноинфекции ИКБ в основном определялись не ранее второй недели от укуса клеща, с максимумом примерно 20% на 15 – 35-й день. При коинфекции с ГАЧ характер формирования иммуноглобулинов класса М к белкам OspC и VisE был сходным, а частота их выявления – существенно выше (рис. 1В, Г). Определение этих иммуноглобулинов на локализованной стадии болезни (в дополнение к IgM и IgG к пептиду С6) не оказывало достоверного влияния на показатель

Рисунок 1.
Частота выявления IgM и IgG в сыворотках больных ИКБ в ФОСФАН на разных сроках после укуса клеща
Доля положительных проб к пептиду С6 с IgG (А) или с IgM (Б) и с IgM к белкам OspC (В) и VisE (Г)

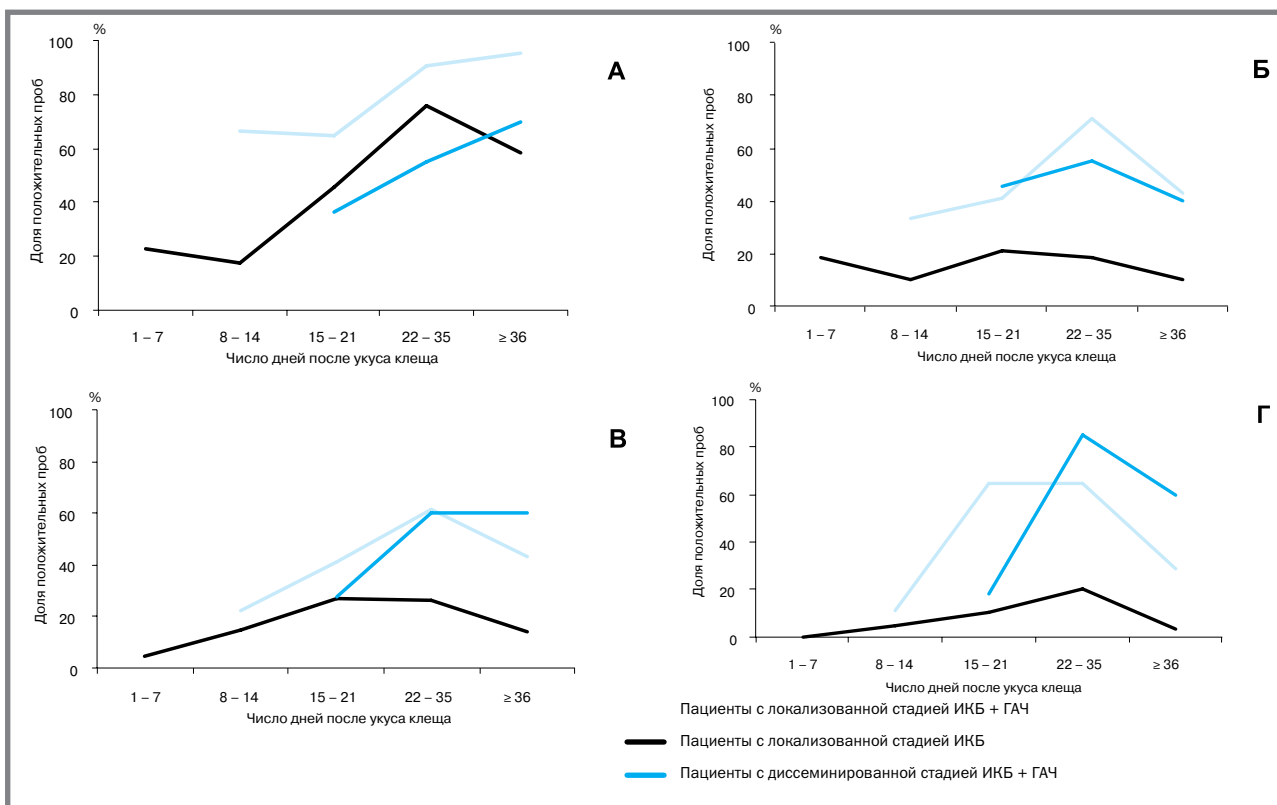
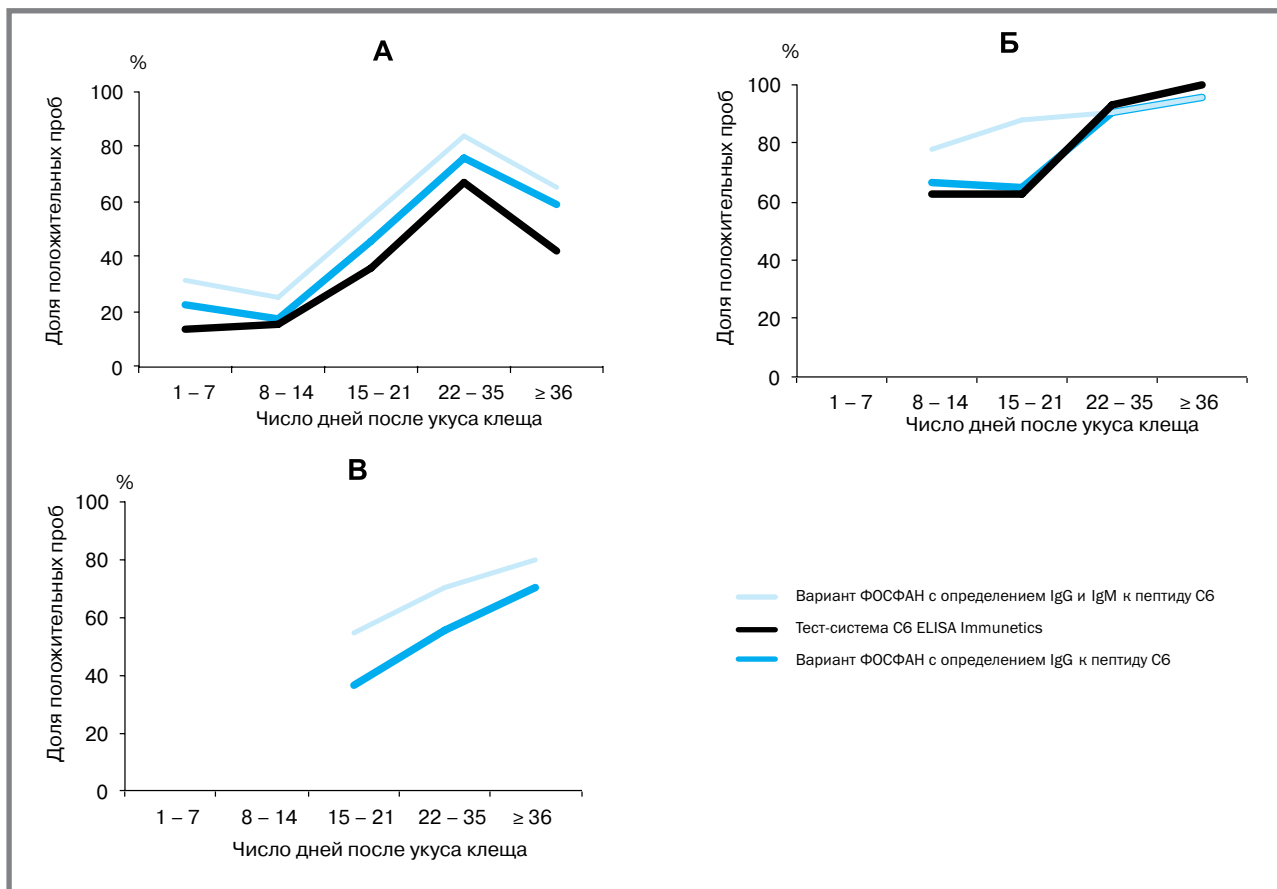


Рисунок 2.

Выявление в сыворотках больных ИКБ IgM и IgG к С6 с использованием двух вариантов ФОСФАН и тест-системы С6 ELISA Immunetics в разные сроки после укуса клеща Пациенты: в локализованной стадии ИБК (А) или с ИКБ+ ГАЧ (Б), в диссеминированной стадии ИКБ + ГАЧ (В)



общей чувствительности анализа, однако за счет выявления сероконверсии у большинства пациентов позволяло повысить информативность исследования в целом.

На диссеминированной стадии ИКБ характер формирования и доля положительных проб с IgM на разных сроках после укуса были сходны с показателями при локализованной стадии ИКБ, сочетавшегося с ГАЧ. Цифры максимальной чувствительности составляли от 60 до 85% (см. рис. 1Б, В, Г). Частота выявления положительных проб с С6-IgG возрастала от 36 до 70% в течение всего периода наблюдений начиная с 3-й недели от укуса (см. рис. 1А). Определение С6-IgM в дополнение к С6-IgG повышало чувствительность анализа ФОСФАН на всех сроках от укуса (рис. 2В), при этом у значительной части пациентов определялись только IgM.

Чувствительность и специфичность анализа ФОСФАН. На рисунке 2 представлены результаты сравнения чувствительности двух вариантов анализа ФОСФАН: в первом определяются только С6-IgG, во втором – IgM и IgG к этому пептиду. Определение суммарных IgM и IgG на локализованной (рис. 2А, Б) или диссеминированной (см. рис. 2В) стадии ИКБ повышало чувствительность анализа ФОСФАН по сравнению с вариантом, в котором определяются только IgG. Этот эффект был особен-

но выражен у пациентов с локализованной стадией ИКБ в сочетании с ГАЧ на ранних сроках после укуса клеща (рис. 2Б) и у больных с диссеминированной стадией болезни в течение всего периода наблюдений (см. рис. 2В). Различия в чувствительности между двумя вариантами анализа ФОСФАН не достигали статистически значимого уровня.

При исследовании сывороток пациентов с локализованной стадией ИКБ установлено хорошее совпадение результатов анализа ФОСФАН, определяющего IgG к пептиду С6, и американской тест-системы С6 ELISA Immunetics (см. рис. 2А, Б). Для установления целесообразности определения IgM к этому пептиду в дополнение к С6-IgG были проанализированы все положительные результаты по выявлению IgM. На локализованной стадии ИКБ С6-IgM выявлены у 36 пациентов. Из них у 23 (50%) больных – в сочетании с С6-IgG; у 7 (19,4%) С6-IgM появились раньше, чем С6-IgG; у 6 (16,7%) С6-IgG не появились ни на одном сроке наблюдений. На диссеминированной стадии ИКБ С6-IgM выявлены у 20 пациентов. Из них у 12 (60%) больных – в сочетании с С6-IgG; у 3 (15,0%) – С6-IgM появились раньше, чем С6-IgG; у 5 (25,0%) С6-IgG не появились ни на одном сроке наблюдений.

На наш взгляд, эти данные подтверждают целесообразность определения суммарных IgM, IgG к пептиду С6 при выполнении мультиплексного

анализа ФОСФАН (по аналогии с американским тестом С6 ELISA Immunetics). Вместе с тем с учетом сведений о возможности длительной персистенции этих антител в отсутствие лечения [9, 26] и негативных результатов в отношении IgG нельзя исключить, что у части обследованных пациентов результат выявления IgM, особенно в дебюте заболевания, мог отражать предшествующий контакт с возбудителем или был ложноположительным.

Специфичность анализа ФОСФАН (по результатам анализа 197 сывороток клинически здоровых доноров крови) составила 99, 98 и 94,4% при определении IgM к С6, VlsE и OspC соответственно; 97% – при определении С6-IgG и 95,9% – при определении суммарных IgM/IgG к пептиду С6. Специфичность американской тест-системы – 98% (проанализировано 100 из 197 сывороток доноров).

Выводы

1. Особенности формирования гуморального иммунного ответа в остром периоде ИКБ включают:
 - преимущественный синтез иммуноглобулинов G к пептиду С6 на локализованной стадии ИКБ (моноинфекция и в сочетании с ГАЧ), в том числе на ранних сроках заболевания;
 - частота выявления IgM и IgG при моноинфекции ИКБ достоверно выше у пациентов, у которых выявлены признаки диссеминации возбудителя (положительный результат ПЦР), а также при сочетанной инфекции с ГАЧ;
 - частота выявления IgM выше на диссеминированной, чем на локализованной, стадии ИКБ; при этом, однако, необходимо исключить вероятность ложноположительного результата у пациентов, у которых не выявлен синтез IgG.
2. Максимальная частота выявления IgM и IgG (к каждому из антигенов) наблюдается на 15 –

28-й день от начала заболевания или на 22 – 35-й день после укуса клеща.

3. Для эффективного серологического подтверждения диагноза ИКБ, особенно на ранних сроках локализованной инфекции, в составе мультиплексного теста достаточно использовать пептид С6 (определение IgM и IgG). Для повышения информативности серологического исследования в целом целесообразно включение белков VlsE и OspC в дополнение к этому пептиду.
4. Мультиплексный анализ на иммуночипах по технологии ФОСФАН™ представляет собой перспективный подход к серологическому подтверждению ИКБ:
 - чувствительность определения антител выше по сравнению с ИФА, в том числе на ранних сроках локализованной стадии ИКБ;
 - выше информативность исследования за счет выявления спектра антител к нескольким антигенам боррелий;
 - гибкий дизайн позволяет включать в состав иммуночипа до 16 антигенов боррелий;
 - микропланшетный формат иммуночипа позволяет использовать навыки работы в области ИФА-диагностики, не требует переобучения персонала и переоборудования лабораторий.

Авторы выражают глубокую благодарность специалистам ФГУП «ГосНИИБП» ФМБА РФ (Москва) Т.А. Быченковой, Н.И. Бекман, Т.А. Канаевой, принимавшим участие на разных этапах исследования, 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 сыворотки крови клинически охарактеризованных пациентов.

Литература

1. Aguerro-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. Wormser G.P., Dattwyler R.J., Shapiro E.D., Halperin J.J., Steere A.C., Klempner M.S. et al. The clinical assessment, treatment, and prevention of Lyme disease, human granulocytic anaplasmosis, and babesiosis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. Clin. Infect. Dis. 2006; 43: 1089 – 1134.
4. Bacon R.M., Biggerstaff B.J., Schriefer M.E., Gilmore R.D., Philipp M.T., Steere A.C. et al. Serodiagnosis of Lyme disease by kinetic enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant VlsE or peptide antigens of *Borrelia burgdorferi* compared with 2-tiered testing using whole-cell lysates. J. Infect. Dis. 2003; 187: 1187 – 1199.
5. Burbelo P.D., Issa A.T., Ching K.H., Cohen J.I., Iadarola M.J., Marques A. Rapid, simple, quantitative and highly sensitive antibody detection for Lyme disease. Clin. Vaccine Immunol. 2010; 17: 904 – 909.
6. 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.
7. Porwancher R.H., Hagerly C.G., Fan J., Landsberg L., Johnson B.J.B., Kopnitsky M. et al. Multiplex immunoassay for Lyme disease using VlsE1-IgG and pepC10-IgM antibodies: improving test performance through bioinformatics. Clin. Vaccine Immunol. 2011; 18: 851 – 859.
8. Чеканова Т.А., Маркелов М.Л., Карань Л.С., Ушакова М.А., Пудова Е.А., Ромашкина А.С. и др. Новые возможности в серологической диагностике иксодовых клещевых боррелиозов с использованием иммуночипа. Клин. лаб. диагн. 2013; 12: 51 – 55.
9. 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.
10. Strle F., Stanek G. Clinical manifestation and diagnosis of Lyme Borreliosis. In: Lyme Borreliosis (Eds.: D. Lipsker and B. Jaulhac). Basel: Karger. Curr. Probl. Dermatol. 2009; 37: 51 – 110.
11. Goettner G., Schulte-Spechtel U., Hillermann R., Liegl G., Wilske B., Fingerle V. Improvement of Lyme borreliosis serodiagnosis by a newly developed recombinant immunoglobulin G (IgG) and IgM line immunoblot assay and addition of VlsE and DbpA homologues. J. Clin. Microbiol. 2005; 43: 3602 – 3609.

12. Branda J.A., Agüero-Rosenfeld M.E., Ferraro M.J., Johnson B.J.B., Wormser G.P., Steere A.C. 2-tiered antibody testing for early and late Lyme disease using only an immunoglobulin G blot with the addition of a VlsE band as the second-tier test. *Clin. Infect. Dis.* 2010; 50: 20 – 26.
13. Wormser G.P., Schriefer M., Agüero-Rosenfeld M.E., Levin A., Steere A.C., Nadelman R.B., Nowakowski J., Marques A., Johnson B.J., Dumler J.S. Single-tier testing with the C6 peptide ELISA kit compared with two-tier testing for Lyme disease. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2013; 75(1): 9 – 15.
14. Branda J.A., Strle F., Strle K., Sikand N., Ferraro M.J., Steere A.C. Performance of United States serologic assays in the diagnosis of Lyme borreliosis acquired in Europe. *Clin. Infect. Dis.* 2013; 57: 333 – 340.
15. Wormser G.P., Tang A.T., Schimmoeller N.R., Bittker S., Cooper D., Visintainer P. et al. Utility of serodiagnostics designed for use in the United States for detection of Lyme borreliosis acquired in Europe and vice versa. *Med. Microbiol. Immunol.* 2014; 203: 65 – 71.
16. Krupka I., Knauer J., Lorentzen L., O'Connor T.P., Saucier J., Straubinger R.K. *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in Europe induce diverse immune responses against C6 peptides in infected mice. *Clin. Vaccine Immunol.* 2009; 16: 1546 – 1562.
17. Sillanpää H., Lahdenne P., Sarvas H., Arnez M., Steere A., Peltomaa M. et al. Immune responses to borrelial VlsE IR6 peptide variants. *Int. J. Med. Microbiol.* 2007; 297: 45 – 52.
18. 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, J.J. McGowan). Totowa, NY: Humana Press; 2008: 233 – 240.
19. Помелова В.Г., Осин Н.С., Коренберг Э.И., Быченкова Т.А., Бекман Н.И., Канаева Т.А. и др. Перспективы серодиагностики природно-очаговых инфекций методом мультиплексного фосфоресцентного микроанализа: Материалы Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 70-летию теории академика Е.Н. Павловского о природной очаговости болезней: Актуальные проблемы природной очаговости болезней. Омск: Издательский центр «Омский научный вестник»; 2009: 61 – 63.
20. Embers M.E., Hasenkamp N.R., Jacobs M.B., Phillip M.T. Dynamic longitudinal antibody responses during *Borrelia burgdorferi* infection and antibiotic treatment of rhesus macaques. *Clin. Vaccine Immunol.* 2012; 19: 1218 – 1226.
21. Aberer E., Schwantzer G. Course of antibody response in Lyme borreliosis patients before and after therapy. *ISRN Immunology.* 2012; 1 – 4. doi:10.5402/2012/719821
22. Воробьева Н.Н. Клиника, лечение, и профилактика иксодовых клещевых боррелиозов. Пермь: Урал-Пресс; 1998. – 136 с.
23. Воробьева Н.Н., Сумливая О.Н. Клинические варианты иксодовых клещевых боррелиозов в остром периоде заболевания. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни.* 2003; 4: 3 – 7.
24. Embers M.E., Jacobs M.B., Johnson B.J.B., Philipp M.T. Dominant epitopes of the C6 diagnostic peptide of *Borrelia burgdorferi* are largely inaccessible to antibody on the parent VlsE molecule. *Clin. Vaccine Immunol.* 2007; 14: 931 – 936.
25. Jones D.D., Delulio G.A., Winslow G.M. Antigen-driven induction of polyreactive IgM during intracellular bacterial infection. *J. Immunol.* 2012; 189: 1440 – 1447.
26. 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.

References

1. Agüero-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. Wormser G.P., Dattwyler R.J., Shapiro E.D., Halperin J.J., Steere A.C., Klempner M.S. et al. The clinical assessment, treatment, and prevention of Lyme disease, human granulocytic anaplasmosis, and babesiosis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 2006; 43: 1089 – 1134.
4. Bacon R.M., Biggerstaff B.J., Schriefer M.E., Gilmore R.D., Philipp M.T., Steere A.C. et al. Serodiagnosis of Lyme disease by kinetic enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant VlsE or peptide antigens of *Borrelia burgdorferi* compared with 2-tiered testing using whole-cell lysates. *J. Infect. Dis.* 2003; 187: 1187 – 1199.
5. Burbelo P.D., Issa A.T., Ching K.H., Cohen J.L., Iadarola M.J., Marques A. Rapid, simple, quantitative and highly sensitive antibody detection for Lyme disease. *Clin. Vaccine Immunol.* 2010; 17: 904 – 909.
6. 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).
7. Porwancher R.H., Hagerly C.G., Fan J., Landsberg L., Johnson B.J.B., Kopnitsky M. et al. Multiplex immunoassay for Lyme disease using VlsE1-IgG and pepC10-IgM antibodies: improving test performance through bioinformatics. *Clin. Vaccine Immunol.* 2011; 18: 851 – 859.
8. Tchekanova T.A., Markelov M.L., Karan' L.S., Ushakova M.A., Pudova E.A., Romashkina A.S. et al. The new possibilities in serologic diagnostics of ixodid tick-borne borrelioses using immunochip. *Clin. Lab. Diagn.* 2013; 12: 51 – 55 (in Russian).
9. 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.
10. Strle F., Stanek G. Clinical manifestation and diagnosis of Lyme Borreliosis. In: *Lyme Borreliosis* (Eds.: D. Lipsker and B. Jaulhac). Basel: Karger. *Curr. Probl. Dermatol.* 2009; 37: 51 – 110.
11. Goettner G., Schulte-Spechtel U., Hillermann R., Liegl G., Wilske B., Fingerle V. Improvement of Lyme borreliosis serodiagnosis by a newly developed recombinant immunoglobulin G (IgG) and IgM line immunoblot assay and addition of VlsE and DbpA homologues. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43: 3602 – 3609.
12. Branda J.A., Agüero-Rosenfeld M.E., Ferraro M.J., Johnson B.J.B., Wormser G.P., Steere A.C. 2-tiered antibody testing for early and late Lyme disease using only an immunoglobulin G blot with the addition of a VlsE band as the second-tier test. *Clin. Infect. Dis.* 2010; 50: 20 – 26.
13. Wormser G.P., Schriefer M., Agüero-Rosenfeld M.E., Levin A., Steere A.C., Nadelman R.B., Nowakowski J., Marques A., Johnson B.J., Dumler J.S. Single-tier testing with the C6 peptide ELISA kit compared with two-tier testing for Lyme disease. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2013; 75 (1): 9 – 15.
14. Branda J.A., Strle F., Strle K., Sikand N., Ferraro M.J., Steere A.C. Performance of United States serologic assays in the diagnosis of Lyme borreliosis acquired in Europe. *Clin. Infect. Dis.* 2013; 57: 333 – 340.
15. Wormser G.P., Tang A.T., Schimmoeller N.R., Bittker S., Cooper D., Visintainer P. et al. Utility of serodiagnostics designed for use in the United States for detection of Lyme borreliosis acquired in Europe and vice versa. *Med. Microbiol. Immunol.* 2014; 203: 65 – 71.
16. Krupka I., Knauer J., Lorentzen L., O'Connor T.P., Saucier J., Straubinger R.K. *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in Europe induce diverse immune responses against C6 peptides in infected mice. *Clin. Vaccine Immunol.* 2009; 16: 1546 – 1562.
17. Sillanpää H., Lahdenne P., Sarvas H., Arnez M., Steere A., Peltomaa M. et al. Immune responses to borrelial VlsE IR6 peptide variants. *Int. J. Med. Microbiol.* 2007; 297: 45 – 52.
18. 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, J.J. McGowan). Totowa, NY: Humana Press; 2008: 233 – 240.
19. Pomelova V.G., Korenberg E.I., Osin N.S., Bychenkova N.A., Bekman N.I., Kanaeva T.A. et al. Prospects of natural foci infections serodiagnosis using the multiplexed phosphorescent immunoassay: Proceedings of the All-Russian conference with international participation celebrated to the 70th anniversary of Academician E.N. Pavlovskii's theory on natural focality of diseases: Actual problems of natural focality of diseases. Omsk: Omsk scientific vestnik. 2009: 61 – 63 (in Russian).
20. Embers M.E., Hasenkamp N.R., Jacobs M.B., Phillip M.T. Dynamic longitudinal antibody responses during *Borrelia burgdorferi* infection and antibiotic treatment of rhesus macaques. *Clin. Vaccine Immunol.* 2012; 19: 1218 – 1226.
21. Aberer E., Schwantzer G. Course of antibody response in Lyme borreliosis patients before and after therapy. *ISRN Immunology.* 2012; 1 – 4. doi:10.5402/2012/719821
22. Vorobyova N.N. Clinical manifestations, treatment, and prophylactics of ixodid tick-borne borrelioses. Perm': Ural Press; 1998 (in Russian).
23. Vorobyova N.N., Syumliivaya 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).
24. Embers M.E., Jacobs M.B., Johnson B.J.B., Philipp M.T. Dominant epitopes of the C6 diagnostic peptide of *Borrelia burgdorferi* are largely inaccessible to antibody on the parent VlsE molecule. *Clin. Vaccine Immunol.* 2007; 14: 931 – 936.
25. Jones D.D., Delulio G.A., Winslow G.M. Antigen-driven induction of polyreactive IgM during intracellular bacterial infection. *J. Immunol.* 2012; 189: 1440 – 1447.
26. 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.