

УДК 616.995.42-02-097

С.Р. Меленко

ВДНЗ "Буковинський державний медичний університет", м. Чернівці

ПЕРЕВАГИ РЕАКЦІЇ ІМУННОГО БЛОТУ ПРИ ЛАЙМ-БОРЕЛІОЗИ

Ключові слова: Лайм-бореліоз, серологічна діагностика, імунний блотинг.

Резюме. Зазначено, що лише реакція імуноблоту є найбільш достовірною і спроможною виділяти ряд борелійних антигенів, які характеризуються різною специфічністю. З усіх антигенів найвищу чутливість для виявлення протиборелійних IgM має OspC, а для відповідних IgG - VlsE. У цілому про виявлення IgM при блот-аналізі можна говорити лише тоді, коли присутні щонайменше два з перерахованих трьох антигенів: 25 kDa (OspC), 39 kDa (BmpA) і 41 kDa (Fla). Натомість IgG при блот-аналізі наявні у тому випадку, коли виявляють п'ять з наступних 10 тестів: 18 kDa, 21 kDa (OspC), 28 kDa, 30 kDa, 39 kDa (BmpA), 41 kDa (Fla), 45 kDa, 58 kDa (не GroEL), 66 kDa і 93 kDa. Описано 6 випадків Лайм-бореліозу, зумовленого комбінацією усіх трьох видів борелій - *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii* та *B. garinii*.

Вступ

Як відомо, бореліоз (хвороба Лайма) є полісистемним інфекційним захворюванням, спричиненим спірохетою *Borrelia burgdorferi*, що передається через укуси кліщів.

Мета дослідження

Визначити переваги різних методів серологічних досліджень при діагностиці Лайм-бореліозу.

Відповідно до рекомендацій Центру контролю та профілактики хвороб США (CDC), затверджено двоетапну схему специфічної діагностики при Лайм-бореліозі [1, 2, 3]. На першому етапі, за наявності клініко-анамнестичних показань, проводиться тестування з допомогою ІФА або нРІФ. За результатами першого етапу дослідження зразки крові зі сумнівними і позитивними результатами повинні бути підтверджені з допомогою методу імуноного блотингу [4, 5].

Результати імуноного блотингу на виявлення IgM проти *B. burgdorferi* можуть бути негативними, пограничними ("сіра зона") і позитивними.

У ранній фазі інфікування бореліями IgM, які можуть бути виявлені в 50-90 % пацієнтів, зазвичай спрямовані проти зовнішнього протеїну C - OspC (p 25) [10]. За умови свіжого інфікування IgM проти інших специфічних антигенів борелій зазвичай ще не виявляються. Частота знаходження специфічних IgG у цій фазі хвороби також дуже низька [11, 12].

IgM проти флагеліну (p41) представляють початкову відповідь організму до *B. burgdorferi*. Проте один позитивний тест на флагелін (p41) при виявленні IgM не може бути доказом свіжого інфікування *B. burgdorferi*. У таких випадках необхідно повторити тест через декілька тижнів.

Для того, щоб здолати проблему неспецифічності визначення IgM, в реакції імуноного блотингу ідентифікують VlsE, який може розглядатися як головний антиген для серологічної діагностики бореліозу. Понад 85 % IgG-позитивних сироваток можна ідентифікувати тільки шляхом оцінки VlsE. Цей антиген є специфічним для усіх різновидів борелій. Ризик несправжньо позитивної реакції практично виключається [13].

У пізній стадії Лайм-бореліозу позитивний тест на IgM не має жодного значення у зв'язку з можливістю їх постійної персистенції, про що йшлося раніше [14].

Для діагностики свіжого інфікування бореліями позитивний результат IgM треба підтвердити виявленням протибореліозних IgG через 3-6 тижнів.

У 20-40 % пацієнтів Лайм-бореліоз перебігає у безритемній формі [15], що значно ускладнює діагностику хвороби. Результати проведених досліджень свідчать про високий відсоток серопозитивних осіб серед пацієнтів неврологічних стаціонарів [16].

Через декілька тижнів або місяців після укусу кліща може розвинути ряд інших симптомів. Антитіла проти *B. burgdorferi* можуть бути виявлені в 50-90 % пацієнтів у стадії II [13]. На ранній фазі цієї стадії знаходять, в основному, антитіла класу IgM, а в пізній фазі часто присутні тільки антитіла класу IgG. Проте рівні специфічних IgM можуть зберігатися протягом тривалого часу [17]. Визначаючи IgG проти VlsE, можна підвищити ефективність серологічного коефіцієнту до 20-30 %. На третій стадії рівні специфічних IgG-антитіл значно підвищені у 90-100 % пацієнтів, тоді як антитіла класу IgM виявляються дуже рідко [13].

За наявності анамнестичних даних про присмокування кліщів, необхідно проводити специфічні серологічні дослідження [18].

Зазвичай IgM з'являються першими у відповідь на інфікування або реактивацію збудника, тому дозволяють виявити гостру стадію первинної інфекції (коли ще немає IgG) або реактивацію хронічної (на тлі виявлення IgG). IgG у типових випадках з'являються через 2-3 тижні після інфікування, є строго специфічними для збудника, зберігаються довічно, але їх рівень не відображає активності процесу [19].

Так, оскільки специфічні сироваткові антитіла виявляються лише у 20-50 % пацієнтів на I стадії захворювання (мігруюча еритема), у 50-90 % - на II стадії (нейробореліоз) і майже у 100 % пацієнтів - тільки на III стадії (акродерматит, Лайм-артрит), то негативний результат не виключає діагнозу захворювання.

Труднощі своєчасного виявлення Лайм-бореліозу зумовлені також можливістю розвитку після зараження інспантного перебігу хвороби без помітних клінічних ознак як у ранній період, так і в період дисемінації збудника [20]. У віддалені терміни в частині інфікованих відбувається активація інфекційного процесу з маніфестацією клінічних проявів, розвитком серйозних органних уражень, які визначають симптоматику хронічної стадії хвороби через місяці й навіть роки після присмокування кліща. Зрозуміло, що через тривалий час після зараження інколи буває важко

пов'язати ураження тих чи інших органів з присмокуванням кліщів у минулому і запідозрити Лайм-бореліоз. Тим більше, що такі пацієнти у більшості випадків перебувають поза увагою інфекціоністів, часто лікуються в інших спеціалістів терапевтичного профілю [18].

Матеріал і методи

Обстежено 6 хворих на Лайм-бореліоз. Для лабораторної діагностики використані серологічні методи ІФА та вестерн-блот. Пацієнтам проведено дослідження сироватки крові на виявлення специфічних антитіл класу IgM та IgG методом ІФА. За допомогою реакції імуного блотингу визначено наявність антитіл до специфічних антигенів борелій. Аналізи проводились за стандартизованими методиками в ліцензованій лабораторії "Сінево"

Обговорення результатів дослідження

Обговорювана реакція імуного блоту дає унікальну можливість визначати усі три види *Borrelia burgdorferi sensu lato*: *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii* та *B. garinii*. Іноді бувають ситуації, коли причиною хвороби Лайма стає не один вид борелій, а їх поєднання. Так, за допомогою методу імуного блотингу у 6 мешканців Чернівецької області ми виявили чіткі серологічні ознаки Лайм-бореліозу, зумовленого комбінацією одразу трьох видів збудників (табл.). Зазначені особи багаторазово наражалися на напад кліщів, що

Таблиця

Результати обстежень хворих на Лайм-бореліоз (блот-аналіз)

Маркер	Хворий					
	О.С.С., 43 р.	С.В.І., 27 р.	Б.І.В., 55 р.	К.В.В., 48 р.	Б.В.В., 58 р.	Ш.В.М., 42 р.
<i>B. burgdorferi</i> , антитіла IgM						
VlsE	-	-	-	-	-	-
p41	-	+	+	+/-	+	+
p39	-	-	-	-	-	-
OspC Ba (<i>B. afzelii</i>)	+/-	+	-	-	-	+/-
OspC Bb (<i>B. burgdorferi</i>)	-	-	-	-	-	-
OspC Bg (<i>B. garinii</i>)	-	-	-	-	-	-
IgM	+/-	+	-	-	-	+/-
<i>B. burgdorferi</i> , антитіла IgG						
VlsE (<i>B. afzelii</i>)	+	+	+	+	+	+
VlsE (<i>B. burgdorferi</i>)	+	+	+	+	+	+
VlsE (<i>B. garinii</i>)	+	+	+	+	+	+
Lipid Ba (<i>B. afzelii</i>)	-	-	+	+/-	+/-	-
Lipid Bb (<i>B. burgdorferi</i>)	+	-	+	+	-	-
p83	-	+	+/-	-	+	+
p41	+	+	+	+	+	+
p39	-	-	+	+	+	+

Продовження таблиці

Результати обстежень хворих на Лайм-бореліоз (блот-аналіз)

OspC (<i>B. afzelii</i>)	+	+	+/-	+	+	+
p58	-	-	+/-	-	+	+
p21	-	-	+/-	+	-	+/-
p20	-	-	-	-	-	-
p19	-	-	+	-	-	+/-
p18	+	+	+	-	-	-
IgG	+	+	+	+	+	+

Примітки: + – виявлений, +/- – пограничний результат, -- не виявлений.

і зумовило їх ко- чи суперінфікування. У кожного пацієнта на підставі епідеміологічних, клінічних і серологічних даних діагностовано еритемну чи безеритемну форму хвороби Лайма, хронічний перебіг, з переважним ураженням нервової системи та суглобів.

Як видно з табл., у більшості пацієнтів виявлено IgM до антигену p41, що, однак, не є специфічним маркером до борелій. Адже зазначений білок-флагелін p41 міститься у багатьох бактерій, передусім спірохетах, і, навіть, в окремих тканинах людського організму. Тому знаходження тільки цього маркера не дає змоги верифікувати IgM та IgG проти борелій. Крім того, згідно з рекомендаціями другої національної конференції із серологічної діагностики хвороби Лайма [3], про виявлення IgM при блот-аналізі можна говорити лише тоді, коли присутні щонайменше два з перерахованих трьох антигенів: 25 kDa (OspC), 39 kDa (BmpA) і 41 kDa (Fla) [21]. Такій вимозі відповідають лише аналізи хворого С.В.І., в якого крім IgM до p41 були знайдені ще й IgM до OspC Va (*B. afzelii*). Це може свідчити або про недавнє інфікування *B. afzelii*, або про залишковий титр IgM, які, як було згадано раніше, іноді можуть утримуватися протягом багатьох років.

Натомість IgG при блот-аналізі наявні у тому випадку, коли виявляють п'ять з наступних 10 тестів: 18 kDa, 21 kDa (OspC), 28 kDa, 30 kDa, 39 kDa (BmpA), 41 kDa (Fla), 45 kDa, 58 kDa (не GroEL), 66 kDa і 93 kDa [22]. В усіх хворих виявили IgG до високоспецифічних VlsE *B. afzelii*, *B. burgdorferi* та *B. garinii*, неспецифічного p41, а також характерні для свіжого інфікування OspC (*B. afzelii*). У кожному випадку були знайдені IgG до мінімум 5 різних антигенів борелій, що дало можливість ідентифікувати специфічність зазначених антитіл.

Висновки

Отже, серологічна діагностика має здійснюватися за принципом двокрокової процедури: спочатку скринінг сироваток за допомогою ELISA або непрямой імунофлюоресценції (IIFT), а далі

зразки крові зі сумнівними і позитивними результатами повинні бути підтверджені з допомогою методу імуного блотингу. При свіжому інфікуванні рекомендовано паралельно виконувати ELISA/IIFT і вестерн-блот, оскільки останній метод дає можливість виявити деякі слабкі реакції, недосяжні для імуноферментного аналізу. Найчутливішим антигеном для виявлення IgM є OspC, а для IgG - відповідно VlsE.

Література. 1. The Pathogenesis of Lyme Neuroborreliosis: From Infection to Inflammation / T. A. Rupprecht, U. Koedel, V. Fingerle, H.-W. Pfister // *Mol. Med.* - 2008. - N 14(3-4). - P. 205-212. 2. Cameron D. J. Evidence assessments and guideline recommendations in Lyme disease: the clinical management of known tick bites, erythema migrans rashes and persistent disease / D. J. Cameron, L. B. Johnson, E. L. Maloney // *Expert. Rev. AntiInfect. Ther.* - 2014. - N 12(9). - P. 1103-1135. 3. Centers for Disease Control. Proceedings of the Second National Conference on Serologic Diagnosis of Lyme Disease // Association of State and Territorial Public Health Laboratory Directors. - 1994. - V. 111. - P. 192. 4. A European multicenter study of immunoblotting in serodiagnosis of Lyme borreliosis / [J. Robertson, E. Guy, N. Andrews et al.] // *J. Clin. Microbiol.* - 2000. - V. 38. - P. 2097-2102. 5. Metoda Western blot jako niezbytny etap diagnostyki serologicznej w kierunku boreliozy z Lyme / [J. Noworyta, M. Machcińska, M. Brasse-Rumin et al.] // *Reumatologia.* - 2012. - V. 50, N 5. - P. 397-402. 6. Serodiagnosis of Lyme Borreliosis by Western Immunoblot: Reactivity of various significant antibodies against *Borrelia burgdorferi* / B. Ma, B. Christen, D. Leung, C. Vignepelfrey // *J. Clin. Microbiol.* - 1992. - Feb. - P. 370-376. 7. Zoller L. Validity of Western Immunoblot band patterns in the serodiagnosis of Lyme Borreliosis / L. Zoller, S. Burkard, H. Schfer // *J. Clin. Microbiol.* - 1991. - Jan. - P. 174-182. 8. Moskopheidis M. Wertigkeit des Immunoblots in der Serodiagnostik der Lyme-Borreliose / M. Moskopheidis, B. Luther // *LAB-med.* - 1995. - Vol. 19. - P. 231-237. 9. Tilton R. C. The laboratory diagnosis of Lyme disease / R. C. Tilton, R. W. Ryan // *J. Clin. Immunology.* - 1993. - Vol. 16. - P. 208-214. 10. Borreliacidal OspC antibodies specific for a highly conserved epitope are immunodominant in human Lyme disease and do not occur in mice or hamsters / S. D. Lovrich, D. A. Jobe, R. F. Schell, S. M. Callister // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* - 2005. - Vol. 12. - P. 746-751. 11. *Borrelia burgdorferi* BmpA, BmpB, and BmpD proteins are expressed in human infection and contribute to P39 immunoblot reactivity in patients with Lyme disease / [A. V. Bryksin, H. P. Godfrey, C. A. Carbonaro et al.] // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* - 2005. - Vol. 12. - P. 935-940. 12. Christova I. Enzyme-linked immunosorbent assay, immunofluorescent assay, and recombinant immunoblotting in the serodiagnosis of early Lyme borreliosis / I. Christova // *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* - 2003. - Vol. 16. - P. 261-268. 13. Wilske B. Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis / B. Wilske, V. Fingerle, U. Schulte-Spechtel // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* - 2007. - Vol. 49. - P. 13-21. 14. MiQ 12/2000 Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik: Lyme-Borreliose / [B. Wilske, L. Zöller, V. Brade et al.]. - München-Jena: Urban & Fischer Verlag, 2000. - 344 p. 15. The Pathogenesis of Lyme

Neuroborreliosis: From Infection to Inflammation / T. A. Rupprecht, U. Koedel, V. Fingerle, H.-W. Pfister // *Mol. Med.* - 2008. - N 14(3-4). - P. 205-212. 16. Cameron D. J. Evidence assessments and guideline recommendations in Lyme disease: the clinical management of known tick bites, erythema migrans rashes and persistent disease / D. J. Cameron, L. B. Johnson, E. L. Maloney // *Expert. Rev. Antinfect. Ther.* - 2014. - N 12(9). - P. 1103-1135. 17. Fas ligand deficiency impairs host inflammatory response / [C. Shi, J. Wolfe, J. Q. Russell et al.] // *Infect. Immun.* - 2006. - Vol. 74. - P. 1156-1160. 18. Зінчук О. М. Лайм-бореліоз. Клініко-епідеміологічні аспекти / О. М. Зінчук // *Інфекційні хвороби.* - 2007. - № 4. - С. 5-11. 19. Lyme borreliosis-diagnostic difficulties in interpreting serological results / O. Gajovic, Z. Todorovic, L. Nestic, Z. Lazic // *Med. Pregl.* - 2010. - N 63(11-12). - P. 839-843. 20. Наумов П. Л. Пораженість населення борреліями и захворюваність болістю Лайма / П. Л. Наумов, И. С. Васильєва // *Мед. паразитол. и паразитарные болезни.* - 2005. - № 2. - С. 40-42. 21. Engstrom S. M. Immunoblot interpretation criteria for serodiagnosis of early Lyme disease / S. M. Engstrom, E. Shoop, R. C. Johnson // *J. Clin. Microbiol.* - 1995. - V. 33. - P. 419-422. 22. Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease / F. Dressler, J. A. Whelan, B. N. Reinhart, A. C. Steere // *J. Infect. Dis.* - 1993. - V. 167. - P. 392-400.

РЕАКЦІЯ ІМУННОГО БЛОТА ПРИ ЛАЙМ-БОРЕЛІОЗЕ

С.Р. Меленко

Резюме. Отмечено, что только реакция иммуноблота является наиболее достоверной и способной выделять ряд боррелийных антигенов, характеризующиеся различной специфичностью. Из всех антигенов самую высокую чувствительность для выявления противоборрелийных IgM имеет OspC, а для соответствующих IgG - VlsE. В целом об обнаружении IgM при блот-анализе можно говорить только тогда, когда присутствуют не менее двух из перечисленных трех антигенов: 25 kDa (OspC), 39 kDa (BmpA) и 41 kDa (Fla). Зато IgG при блот-анализе имеющихся в том случае, когда обнаружи-

вают пять из следующих 10 тестов: 18 kDa, 21 kDa (OspC), 28 kDa, 30 kDa, 39 kDa (BmpA), 41 kDa (Fla), 45 kDa, 58 kDa (не GroEL), 66 kDa и 93 kDa.

Описаны 6 случаев Лайм-боррелиоза, обусловленного комбинацией всех трех видов боррелий - *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii* и *B. garinii*.

Ключевые слова: Лайм-боррелиоз, серологическая диагностика, иммунный блотинг.

ADVANTAGES OF THE IMMUNE BLOT REACTION AT LIME-BORELIOSI

S.R. Melenko

Abstract. It has been indicated that only the reaction of immunoblot is the most reliable and may distinguish a number of borelii antigens which are characterized by different specificity. From all antigens QspC has the highest sensitivity to detection of antiborelii IgM, and VlsE - for all corresponding IgG. As a whole it is possible to speak about IgM detection in case of blot-analysis only, when not less than two from the listed three antigens are present: 25 kDa (OspC), 39 kDa (BmpA) and 41 kDa (Fla). However, IgG at blot-analysis are available in the case, when five from the following 10 tests are detected: 18 kDa, 21 kDa (OspC), 28 kDa, 30 kDa, 39 kDa (BmpA), 41 kDa (Fla), 45 kDa, 58 kDa (not GroEL), 66 kDa and kDa.

Six cases of Lime-boreliose stipulated by combination of all three kinds of borelii and *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii* and *B. garinii* have been described.

Key words: Lime borelioz, serologic diagnostics, immune blotting.

HSEE of Ukraine " Bukovinian State Medical University", Chernivtsi

Clin. and experim. pathol. - 2016. - Vol. 15, №3 (57). - P. 76-79.

Надійшла до редакції 10.08.2016

Рецензент – проф. І.Й. Сидорчук

© С.Р. Меленко, 2016