

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Теслова О.Е.^{1,2}, Муталинова Н.Е.^{1,2}, Рудакова С.А.¹, Кузьменко Ю.Ф.^{1,2}, Рудаков Н.В.^{1,2}

АНАЛИЗ ГЕНОВИДОВОЙ СТРУКТУРЫ ЗАБОЛЕВАНИЙ НАСЕЛЕНИЯ ИКСОДОВЫМИ КЛЕЩЕВЫМИ БОРРЕЛИОЗАМИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИММУНОБЛОТТИНГА

¹ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора, г. Омск, 644080, Россия;

²ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, г. Омск, 644099, Россия

*Геновидовые особенности боррелий находят отражение в характере органических поражений, что обуславливает полиморфизм клинической картины в зависимости от этиологии заболевания. Проанализированы результаты исследования методом иммуноблоттинга сывороток крови больных иксодовыми клещевыми боррелиозами и изучена возможность применения данного метода для установления геновидового разнообразия патогенных боррелий комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Определена роль различных геновидов боррелий в развитии заболеваний иксодовыми клещевыми боррелиозами на территории юга Западной Сибири. Проведено исследование 982 образцов сывороток крови лиц, пострадавших от нападения клещей, из которых у 181 обследованного обнаружены антитела к боррелиям. Специфические антитела классов IgM и IgG к боррелиям определяли методом ИФА с использованием коммерческих наборов. В последующем 63 положительные сыворотки отобраны для постановки иммуноблоттинга. В результате исследования методом иммуноблоттинга специфические антитела к *B. garinii* обнаружены в 53,8% случаев из общего числа положительных образцов, 15,4% - *B. afzelii*, 7,7% приходится на *B. sensu stricto* и 3,8% на *B. spielmanii*. В подавляющем большинстве выявлены антитела к антигенам *B. garinii* (в 3,5 раза чаще, чем к *B. afzelii*).*

Ключевые слова: иксодовые клещевые боррелиозы; серологическая диагностика; иммуноблоттинг

Для цитирования: Теслова О.Е., Муталинова Н.Е., Рудакова С.А., Кузьменко Ю.Ф., Рудаков Н.В. Анализ геновидовой структуры заболеваний населения иксодовыми клещевыми боррелиозами с использованием иммуноблоттинга. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69 (10): 556-560.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-10-556-560>

Для корреспонденции: Рудакова Светлана Анатольевна, д-р мед. наук, зав. лаб. молекулярной диагностики с группой клещевых боррелиозов, гл. науч. сотр.; зав. отделом природно-очаговых бактериальных зоонозов; e-mail: svetruda@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 17.11.2023
Принята к печати 15.07.2024
Опубликовано 00.10.2024

Teslova O.E.^{1,2}, Mutalynova N.E.^{1,2}, Rudakova S.A.¹, Kuzmenko J.F.^{1,2}, Rudakov N.V.^{1,2}

ANALYSIS OF THE GENE SPECIES STRUCTURE OF IXODID TICK-BORNE BORRELIOSIS DISEASES USING IMMUNOBLOTTING

¹ Omsk Research Institute of Natural Focal Infections, 644080, Omsk, Russia;

² Omsk State Medical University, 644099, Omsk, Russia

The gene-species characteristics of Borrelia are reflected in the nature of organ lesions, which causes clinical polymorphism depending on the etiology of the disease. The results of the study of blood sera of patients with ixodic tick-borne borreliosis using immunoblotting was presented, the possibility of using this method to establish the genotypes diversity of borrelia of the Borrelia burgdorferi sensu lato complex have been studied. The role of different genotypes of borrelia in the development of tick-borne borrelioses in the south of Western Siberia has been determined. The blood serum samples of 982 persons who affected by tick bite was investigated, 181 examined persons had antibodies to borrelia. Specific antibodies of IgM and IgG classes to borrelia were determined by ELISA using commercial kits. Subsequently, 63 positive sera were analysed by immunoblotting. Specific antibodies to B. garinii were found in 53,8 % of the total number of positive samples, 15, 4 % - to B. afzelii, 7, 7 % to B. sensu stricto and 3, 8 % to B. spielmanii as a result of immunoblot analysis. Most of them the antibodies to B. garinii (3, 5 times more often than to B. afzelii) were found.

Key words: tick-borne borrelioses; serological diagnosis; immunoblotting

For citation: Teslova O.E., Mutalynova N.E., Rudakova S.A., Kuzmenko J.F., Rudakov N.V. Analysis of the gene species structure of ixodic tick-borne borreliosis diseases using immunoblotting. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (10): 556-560 (in Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-10-556-560>

For correspondence: Rudakova S.A., MD, DSc, Head of the Laboratory for Molecular Diagnostics with a Group of Tick-Borne Borrelioses, Chief Scientific Officer; Head of the Department of Zoonotic Infections; e-mail: svetruda@mail.ru

Information about authors:

Teslova O.E., <https://orcid.org/0000-0002-1897-5522>;
Mutalynova N.E., <https://orcid.org/0000-0002-9572-7792>;
Rudakova S.A., <https://orcid.org/0000-0001-6262-129X>;
Kuzmenko J.F., <https://orcid.org/0000-0001-8267-7012>;
Rudakov N.V., <https://orcid.org/0000-0001-9566-9214>.

Conflict of interests. *The authors declare the absence of conflict of interests.*

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 17.11.2023

Accepted 15.07.2024

Published 00.10.2024

Введение. Иксодовые клещевые боррелиозы (ИКБ) занимают ведущее место в Российской Федерации среди природно-очаговых инфекций, передающихся клещами [1,2].

Иксодовые клещевые боррелиозы - инфекционное природно-очаговое заболевание с трансмиссивным путём передачи, вызываемое бактериями рода *Borrelia* семейства *Spirochaetaceae*, характеризующееся полиморфизмом клинических проявлений с преимущественным поражением кожи, нервной системы, сердца, опорно-двигательного аппарата, имеющее склонность к хроническому и рецидивирующему течению [3,4]. Возбудителями иксодовых клещевых боррелиозов являются различные геновиды боррелий, относящиеся к комплексу *Borrelia burgdorferi sensu lato*, включающему более 20 генотипов по всему миру [5-7].

Установление видовой принадлежности возбудителя является важным аспектом при лабораторной диагностике и лечении клещевого боррелиоза. Генотипические особенности возбудителя в определённой мере влияют на клинические проявления болезни. С геновидом боррелий связывают особенности органного характера поражений, например, мигрирующая эритема наблюдается наиболее часто (до 90%) при инфицировании *B. afzelii*, тогда как *B. garinii* обуславливает преимущественно поражение нервной системы (до 40%). *B. burgdorferi sensu stricto* обуславливает преимущественное поражение опорно-двигательного аппарата.

В 2022 году в Российской Федерации зарегистрировано 7264 случая ИКБ, по сравнению с 2021 годом произошёл рост в 1,9 раза, показатель заболеваемости составил 4,98 на 100 тыс. населения и соответствует среднесрочному показателю заболеваемости ИКБ в России за последние двенадцать лет (СМП₂₀₁₀₋₂₀₂₁ составил 4,62 на 100 тыс. населения). Рост заболеваемости отмечается во всех федеральных округах России.

Для диагностики ИКБ разработан широкий круг различных по своей диагностической ценности лабораторных тестов. Используют прямые методы, направленные на обнаружение в исследуемом материале самих боррелий или их генетического материала. К таким методам относятся: бактериологический (культивирование на питательной среде с последующей идентификацией), микроскопический, молекулярно-биологический (обнаружение нуклеиновых кислот возбудителя). Применяют непрямые методы исследования: серологические, направленные на обнаружение антител к боррелиям в сыворотке крови.

Прямые методы выявления возбудителей ИКБ (посев на питательные среды, ПЦР) из клинического материала, взятого от больного (обычно кровь), мало информативны в связи с низким содержанием боррелий (их ДНК). В связи с этим, методы выявления боррелий, в большинстве случаев, не позволяют проводить видоспецифическую верификацию случаев ИКБ у больных.

Определение антител к боррелиям в биологическом

материале является основным методом лабораторной диагностики клещевых боррелиозов. Для установления диагноза используют методы серологической диагностики, такие как ранее применявшаяся реакция непрямой иммуофлюоресценции (РНИФ), так и современные высокочувствительные методы диагностики на основе непрямого иммуоферментного анализа (ИФА) и иммунного блоттинга (ИБ) [8-10].

На первом этапе серологического исследования следует использовать скрининговый метод ИФА, на втором этапе полученные положительные образцы подтверждать методом ИБ, поскольку ИБ позволяет выявлять не суммарные антитела ко всему спектру антигенных детерминант, а антитела к конкретным антигенам боррелий, что снижает вероятность ложноположительных результатов [11-12]. При правильной интерпретации результатов комбинации ИФА и ИБ, как показывает опыт, вполне достаточны для серологической диагностики описанного заболевания [12]. На практике в Российской Федерации такой двухшаговый алгоритм тестирования используют редко ввиду его высокой стоимости. Серологические методы лабораторной диагностики на ранних этапах малоэффективны в силу особенностей иммунного ответа при боррелиозной инфекции. Необходимо повторное исследование (через 3-4 недели от предыдущего) сывороток больных с подозрением на ИКБ [13,14]. Результаты серологического обследования зависят от многих факторов, среди которых большое значение имеют сроки обследования, формы и стадии болезни, проведение антибактериальной терапии.

Цель работы - проанализировать результаты ИБ сывороток крови больных ИКБ как метода выявления антител к различным геновидам боррелий комплекса *B. burgdorferi sensu lato* и оценки их вклада в заболеваемость иксодовыми клещевыми боррелиозами на территории юга Западной Сибири.

Материал и методы. В качестве материала для исследования использованы сыворотки крови, полученные от больных различными формами иксодового клещевого боррелиоза в разные периоды заболевания, от лиц, подвергшихся нападению клещей, поступившие в лабораторию НИИ природно-очаговых инфекций за эпидемический сезон 2019 года.

На первом этапе исследования проведён анализ образцов сывороток крови методом ИФА на наличие антител к антигенам *B. burgdorferi s.l.*, используя тест-систему «ЛаймБест-IgM» и «ЛаймБест-IgG» (АО «Вектор-Бест», Новосибирск). Регистрация результатов проведена с помощью фотометра для микропланшет модель 680 (ООО «Био-Рад Лаборатория», Москва). При обработке результатов использованы значения оптической плотности (ОП) с последующим расчетом значений (ОП_{крит.}) и коэффициента серопозитивности сыворотки по формулам, приведенным в инструкциях. Измеряли оптическую плотность в двух-

волновом режиме: основной фильтр - 450 нм, референс-фильтр - в диапазоне 620-655 нм.

На втором этапе из числа исследованных методом ИФА проб отобраны положительные в ИФА сыворотки крови, для постановки реакции ИБ с высоко очищенными рекомбинантными антигенами *B. burgdorferi s.l.* для выявления антител к боррелиям комплекса *B. burgdorferi sensu lato*. Используются тест-системы recom-Line Borrelia IgG и recom-Line Borrelia IgM (Mikrogen Diagnostik, Германия). Высоко специфичные антигены p100 (*B. afzelii*), VlsE (различные штаммы), p58 (*B. garinii*), p41 (*B. burgdorferi sensu stricto*), p39 (*B. afzelii*), OspA (*B. afzelii*), OspC (*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. spielmanii*), p18 (*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. spielmanii*, *B. bavariensis*), нанесенные на нитроцеллюлозную мембрану

тест-стрипа, после инкубации с образцами сывороток человека и реагентами, входящими в состав набора, проявятся в виде темноокрашенных полос в соответствующем месте. Проявленные полосы соответствуют антителам к различным геновидам боррелий, связавшимся со специфическими антигенами, фиксированными на тест-стрипе.

Данная тест-система позволяет выявлять специфические антитела к антигенам не только *B. afzelii* и *B. garinii* – основным патогенным геновидам, циркулирующим в России, но и к *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. spielmanii*, *B. bavariensis*.

Анализ тест-полосок проводился визуально, по оценке степени интенсивности окрашивания полос по отношению к cut-off полосе, согласно инструкции к тест-системе (рис. 1, табл. 1).

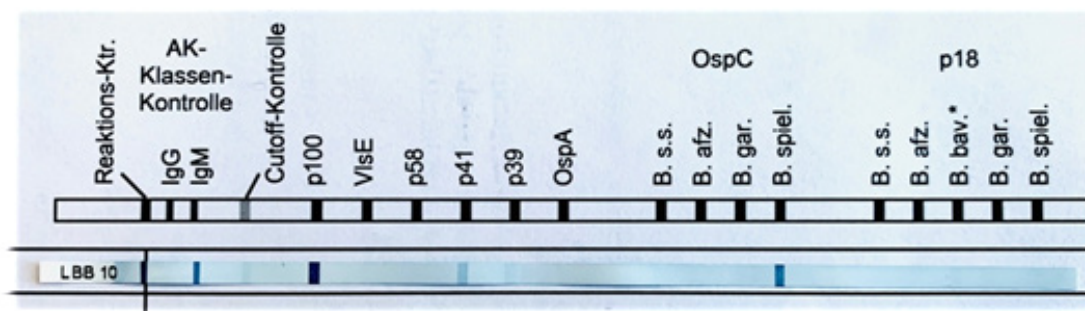


Рис. 1. Шаблон для оценки результатов с тест-стрипом.

Таблица 1

Оценка интенсивности полос по отношению к cut-off полосе

Интенсивность окрашивания полос	Оценка
Нет реакции	-
Очень слабая (слабее, чем у полосы cut-off)	+/-
Слабая (такая же, как у полосы cut-off)	+
Сильная (сильнее, чем у полосы cut-off)	++
Очень сильная	+++

Результат теста интерпретировали по суммарному количеству баллов в соответствии с табл. 2 и индивидуальной реактивности полос по отношению к полосе cut-off.

Таблица 2

Оценка баллов по обнаруженным антигенам

Антиген	Баллы IgG	Баллы IgM
p100	5	5
VlsE	6	5
p58	4	4
p41	1	1
p39	5	4
OspA	5	5
OspC	5	8
p18	5	5

По полученной сумме баллов ставили оценку образцу (положительный, отрицательный или сомнительный) в соответствии с табл. 3.

Интерпретация результата по суммарному количеству баллов

Сумма баллов	Оценка IgG	Сумма баллов	Оценка IgM
≤ 5	Отрицательная	≤ 5	Отрицательная
6-7	Сомнительная	6	Сомнительная
≥ 8	Положительная	≥ 7	Положительная

Результаты и обсуждение. На первом этапе методом ИФА исследовано 982 образца сывороток крови от лиц, подвергшихся нападению клещей. Их них 181 образец крови положительный, в них выявлены антитела классов IgM и IgG в различных разведениях от 1/100 до 1/12800, что составило 18,4% от всех исследованных проб. Антитела класса IgM обнаружены в 105 образцах крови (58,0%), IgG - в 57 образцах (31,5%), сочетание обоих классов антител наблюдалось в 19 случаях (10,5% из всех положительных образцов соответственно).

На втором этапе исследования для реакции ИБ отобрано 63 образца из числа проб, положительных в ИФА. В результате проведения теста второго уровня положительный результат подтвердился в 26-ти пробах, что составило 41,3% из отобранных образцов, у 22 проб

результат оказался отрицательным, что составило 34,9%. У 23,8% образцов методом ИФА обнаружены антитела класса IgG к цитомегаловирусу и вирусу Эпштейн-Барра, что объясняет появление неспецифической реакции при определении антител класса IgM в ИБ.

Видовая структура возбудителей ИКБ распределилась следующим образом: специфические антитела к *B. garinii* обнаружены в 53,8% случаев из общего числа положительных образцов, 15,4% - *B. afzelii*, 7,7% приходится на *B. sensu stricto* и 3,8% на *B. spielmanii*. Присутствуют образцы с сочетанным содержанием двух или трех видов боррелий, их доля составляет 3,8-7,7% от общего количества положительных образцов (рис. 2). В подавляющем большинстве выявлены антитела к антигенам *B. garinii*, в 3,6 раза чаще, чем к *B. afzelii*.

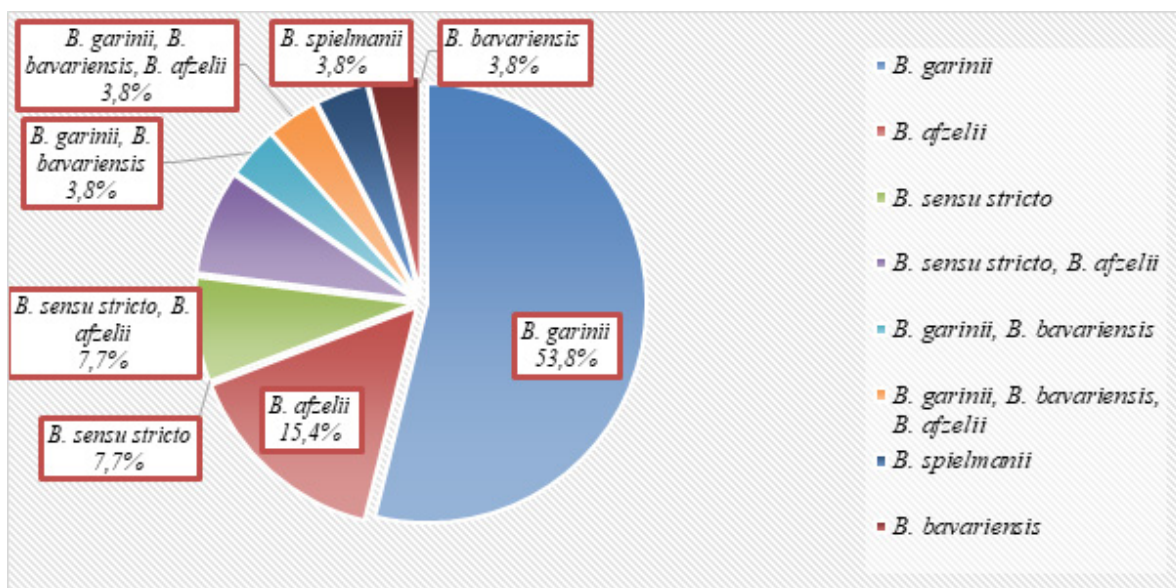


Рис. 2. Видовая структура возбудителей иксодовых клещевых боррелиозов.

За последние десятилетия накоплен огромный опыт по диагностике иксодовых клещевых боррелиозов, однако до сих пор остаются сложности в постановке окончательного клинического диагноза. Не вызывает сомнения, что диагностика ИКБ должна проводиться комплексно, учитывая эпидемиологический анамнез, клинические проявления пациента и лабораторные тесты. Прямые методы диагностики успешно реализуются в отношении переносчиков, снятых с пациентов и из природных стадий, давая лишь оценку возможного риска заражения.

Серологические методы являются основными в клинической лабораторной диагностике ИКБ. ИБ может быть рекомендован в качестве подтверждающего теста и дополнительного метода определения геновидовой принадлежности случаев ИКБ. Проблема диагностики клещевых трансмиссивных инфекций остается по-прежнему актуальной, поэтому необходимо дальнейшее совершенствование различных методов лабораторного подтверждения этой группы инфекций, включая использование метода ИБ для их дифференциальной лабораторной диагностики.

ЛИТЕРАТУРА (ПП. 3-8, 10, 11, 14 СМ. REFERENCES)

1. Коренберг Э.И. Инфекции, передающиеся иксодовыми клещами в лесной зоне, и стратегия их профилактики: изменение приоритетов. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2013; 5:7-17.
2. Рудакова С.А., Пенъевская Н.А., Блох А.И., Рудаков Н.В., Транквилевский Д.В., Савельев Д.А., Теслова О.Е., Канешова Н.Е. Обзор эпидемиологической ситуации по иксодовым клещевым боррелиозам в Российской Федерации в 2010-2020 гг. и прогноз на 2021 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 2:52-61. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-52-61.
9. Манзеньюк И.Н., Манзеньюк О.Ю. Клещевые боррелиозы (болезнь Лайма): пособие для врачей. ЗАО «Вектор-Бест». — Кольцово; 2005.
12. Ананьева Л.П., Насонова В.А., Барскова В.Г., Стир А. Применение вестерн-иммуноблоттинга для определения сывороточных IgG-антител к антигенам различных генотипов боррелий - *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia afzelii* и *Borrelia garinii*. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 2002; 2:5-8.
13. Лобзин Ю.В., Усков А.Н., Козлов С.С. Лайм-боррелиоз (иксодовые клещевые боррелиозы). СПб: Фолиант; 2000.

REFERENCES

1. Korenberg E.I. Infections transmitted by ixodid ticks in the forest zone and a strategy for their prevention: changing priorities. *Epidemiologiya i Vaksino profilaktika*. 2013; 5:7-17. (in Russian)
2. Rudakova S.A., Pen'evskaya N.A., Blokh A.I., Rudakov N.V., Trankvilevsky D.V., Savel'ev D.A., Teslova O.E., Kaneshova N.E. Review of the epidemiological situation on ixodic tick-borne Borreliosis in the Russian Federation in 2010-2020 and prognosis for 2021. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsiy*. 2021; 2:52-61. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-52-61. (in Russian)
3. Stanek G., Wormser G.P., Gray J., Strle F. Lyme borreliosis. *Lancet*. 2012; 379:461-73. DOI: 10.1016/S0140-6736(11)60103-7.
4. Wilske B. Diagnosis of Lyme Borreliosis in Europe. *Vector-Borne*

5. Richter D., Postic D., Sertour N., Livey I., Matuschka F.R., Baranton G. Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu lato* species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2006; 56(Pt 4):873-81. DOI: 10.1099/ijs.0.64050-0.
6. Wang G., Liveris D., Mukherjee P., Jungnick S., Margos G., Schwartz I. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi*. *Curr. Protoc. Microbiol.* 2014; 34:12C.5.1-12C.5.31. DOI: 10.1002/9780471729259.mc12c05s34.
7. Wang G., van Dam A.P., Schwartz I., Dankert J. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi sensu lato*: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:633-53. DOI: 10.1128/CMR.12.4.633.
8. Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for test performance and interpretation from the Second national Conference on Serologic Diagnosis of Lyme Disease. *MMWR Morbid Mortal Wkly Rep.* 1995; 44: 590-1.
9. Manzenyuk I.N., Manzenyuk O.Yu. Tick-borne borreliosis (Lyme disease): a guide for physicians. Koltsovo; Vector-best; 2005.
10. Goossens H.A., van den Bogaard A.E., Nohlmans M.K. Serodiagnosis of Lyme borreliosis using detection of different immunoglobulin (sub) classes by enzyme-linked immunosorbent assay and Western blotting. *Clinical Laboratory*. 2001; 47(1-2):41-9.
11. Robertson J., Guy E., Andrews N., Wilske B., Anda P., Granström M. et. al. A European multicenter study of immunoblotting in serodiagnosis of lyme borreliosis. *Journal of clinical microbiology*. 2000; 38(6):2097-102. DOI: 10.1128/JCM.38.6.2097-2102.2000.
12. Anan'eva L.P., Nasonova V.A., Barskova V.G., Stir A. Use of western-immunoblotting to determine serum IgG-antibodies to antigens of different genotypes of *Borrelia* - *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia afzelii*, and *Borrelia garinii*. *Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni*. 2002; 2:5-8. (in Russian)
13. Lobzin Yu.V., Uskov A.N., Kozlov S.S. Lyme borreliosis (Ixodid tick-borne borreliosis). St. Petersburg: Foliant; 2000. (in Russian)
14. Brunner M., Sigal L.H. Immune complexes from serum of patients with Lyme disease contain *Borrelia burgdorferi* antigen and antigen-specific antibodies: potential use for improved testing. *Journal of Infection Diseases*. 2000; 182(2):534-9. DOI: 10.1086/315724.