

УДК: 616-097

КРИТЕРИИ ПОЗИТИВНОСТИ ДЛЯ IgG АНТИТЕЛ В МЕТОДЕ ИММУННОГО БЛОТТИНГА ПРИ БОЛЕЗНИ ЛАЙМА

В.Г. Барскова*, Л.П. Ананьева*, В.А. Насонова*, А.С. Смир**

* Институт ревматологии РАМН, Москва, Россия

** Новоанглийский медицинский центр, Бостон, США

Резюме.

В настоящее время в России не существует единых унифицированных критериев для диагностики болезни Лайма методом вестерн-блот.

Цель исследования. Разработка критериев серопозитивности для IgG антител с акцентом на диагностику болезни Лайма у пациентов с суставными проявлениями.

Материал и методы. 97 пациентов с болезнью Лайма, контрольная группа сывороток - 145 образцов. Антиборрелиозные антитела класса IgG исследовались с тремя штаммами *Borrelia burgdorferi sensu lato* методом вестерн-блот, подготовленным мануфактурным способом. Лучшая распознавательная способность теста достигалась наличием 3 из 11 IgG антител. Такая дефиниция может быть использована для всех трех штаммов *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii* и *B. afzelii*.

Результаты. При данном подходе позитивный результат был обнаружен в 0-18% случаев у пациентов с локальной мигрирующей эритемой < 4 недель длительности, в 23%-39% случаев диссеминированной инфекции < 20 недель длительности, в 39%-46% случаев поздних артритов/артралгий > 6 месяцев (специфичность 93%-99%).

Заключение. IgG вестерн-блот при ограниченной чувствительности может повысить специфичность серологического тестирования у пациентов с болезнью Лайма.

Ключевые слова: болезнь Лайма, вестерн-блот, артриты.

Болезнь Лайма (БЛ) - инфекционное, природно-очаговое, трансмиссивное заболевание, вызываемое спирохетой *B. burgdorferi* (Bb) и при укусах иксодовыми клещами. БЛ поражает многие органы и системы организма, однако наиболее часто встречается поражение кожи, суставов, нервной системы и сердца [13].

Значительная часть мирового нозоареала БЛ находится в России [3]. И в Европе и в Азии этот клещевой спирохетоз может вызываться тремя штаммами Bb sensu lato, B. afzelii, Bb sensu stricto и B. garinii [6]. Несмотря на то, что некоторые симптомы болезни, например, мигрирующая эритема, были известны в России давно, описание суставного синдрома как проявления разных стадий болезни относится к недавнему времени [1,4].

В США, где циркулирует лишь один па-

тогенный генотип боррелии (Bb sensu stricto), рекомендуется двухступенчатый подход к серологической диагностике. Первой ступенью является обследование сыворотки методом иммуноферментного анализа (ИФА) или в непрямой реакции иммунофлюоресценции (ИРИФ). В случае получения позитивного или сомнительного результатов требуется подтверждение серопозитивности методом вестерн-блот (ВБ).

Центр по контролю над заболеваемостью США (CDC) рекомендовал единые критерии для ВБ - наличие 5 из 10 диагностически значимых полос специфических антител [8]. Однако в Европе и Азии не существует единых унифицированных критериев. Основная причина этого заключается в штаммовой гетерогенности возбудителя, циркулирующего в Евразии [6].

Использование ВБ у российских пациентов с БЛ показало, что набор белков, с которыми наиболее часто и ярко реагировали сыворотки, был различным для каждого из трех

Адрес для переписки:

В.Г. Барскова,
115522, Москва, Каширское шоссе, 34-а
Институт ревматологии РАМН,
тел.: (095) 114-34-29.

изученных штаммов, относящихся к разным генотипам [5]. Стандарт серопозитивности CDC, примененный к американскому штамму B31, "работал" только в 19% случаев, а к российскому штамму IP-3 - в 30%.

Первый российский опыт применения двухступенчатой диагностики БЛ показал необходимость применения отечественных штаммов возбудителей и разработки собственных критериев серопозитивности в ВБ [2].

Цель предпринятого нами исследования заключалась в разработке критериев серопозитивности в ВБ для IgG антител с акцентом на диагностику БЛ у пациентов с суставными проявлениями.

Материал и методы.

Было отобрано 97 пациентов с БЛ, которые наблюдались в Институте ревматологии РАМН. Большинство пациентов подверглись укусу клеща в Московской области. Диагноз установлен на основании наличия мигрирующей эритемы (МЭ), обнаруживаемой при осмотре или в анамнезе.

МЭ, являющаяся первым и главным клиническим критерием БЛ, определялась нами согласно рекомендациям CDC, общепринятым во всем мире [7]. Эритема характеризовалась как распространяющееся пятно, чаще в виде классического кольцевидного элемента с просветлением в центре и эритематозным венчиком по периферии. Иногда окраска эритемы была гомогенной. Обязательными условиями были следующие: размер эритемы более 5 см в диаметре и ее описание авторами или другими врачами, имеющими опыт в диагностике БЛ.

Основываясь на общепринятом делении болезни на стадии, все пациенты были разделены на 4 группы. Первая группа - 17 пациентов с локальной МЭ длительностью не более 4 недель. Вторая группа - 8 пациентов с хронической МЭ более 4 недель без каких-либо других клинически выявляемых признаков болезни. Третья группа - 44 пациента, у которых вслед за МЭ развились признаки диссеминированной инфекции, длящиеся < 20 недель. Основными клиническими проявлениями стадии диссеминации явились вторичные эритемы, миокардит с/без атриовентрикулярной блокады, парез лицевого нерва, радикулярный синдром, артралгии или интермиттирующий артрит. Четвертая группа - 28 пациентов, у которых в течение полугода после МЭ возникло поражение суставов в виде олигоартрита и артралгии, длящееся более 6 месяцев и не от-

носящееся к другим известным видам артритов. Сыворотки этих пациентов хранились при температуре -20°C. Контрольная группа сывороток составила 145 образцов. Из них 30 от больных с болезнью Бехчета, 28 с болезнью Рейтера, 19 с фибромиалгией и 58 с другими ревматическими заболеваниями, включая ревматоидный артрит, остеоартроз, очаговую склеродермию, 10 сывороток от здоровых лиц.

Техника вестерн-блота. Антиборрелиозные антитела класса IgG исследовались с тремя штаммами Bb *sensu lato*. Выявление антител к Bb *sensu stricto* штамм B-31 (изолированный из клещей I. scapularis, штат Нью-Йорк) проводилось с помощью коммерческого набора реагентов для выполнения вестерн-блота. Подготовка антигена двух других штаммов - B. garinii штамм Ip-90 (изолированный из клещей I. persulcatus, Хабаровский край) и B. afzelii штамм Ip-3 (изолированный из клещей I. ricinus, Ленинградская область) выполнено специально для исследования. Собственно исследование проведено согласно инструкции, прилагающейся к каждому набору, куда также входили контрольные сыворотки (позитивный, слабопозитивный и отрицательный контроли). Считывание результата проводилось следующим образом: в случае наличия в сыворотке антител, они реагировали в определенном локусе с уже нанесенными специфическими белками определенного молекулярного веса по принципу антиген-антитело на полосе (стрипе), окрашиваясь в синий цвет. Для определения молекулярного веса антител проводилось сравнение стрипов, на которые была нанесена исследуемая сыворотка и позитивный контроль. Молекулярный вес фиксировался лишь в том случае, если окраска локусов была не бледнее такового на слабопозитивном контроле, за который принимается стрип с нанесенным флагелярным белком Bb весом 41 кДа.

Статистика. Статистический анализ проведен с помощью кси-квадрата, точного метода Фишера. Был также использован метод построения характеристических кривых в целях достижения компромисса между чувствительностью и специфичностью (рис.). По оси ординат обозначена частота истинно положительных результатов (чувствительность), по оси абсцисс - частота ложноположительных результатов (1 минус специфичность) по всему диапазону точек разделения. Значение по осям соответствует вероятностям от 0 до 1 (т.е. от 0 до 100%). Кривые отображают, как меняются

специфичность и чувствительность метода в зависимости от того, сколько локусов наиболее часто встречаемых антител мы выбираем для серологического подтверждения диагноза (от 11 до 1).

Результаты. Среди 97 пациентов с БЛ наиболее выраженный антителный ответ отмечался к белкам весом 39, 41, 45, 58 кДа (таблица 1). Частота реагирования среди 3 штаммов Bb sensu lato была одинаковой. Исключение составили два белка. Белок весом 37 кДа выявлялся чаще при исследовании сывороток с применением штамма B.garinii, а белок весом 39 кДа - при использовании штамма B. afzelii. Среди 145 контрольных образцов реактивность с различными белками боррелии обнаруживалась лишь в нескольких сыворотках. Однако применяя штамм B. garinii, мы выявили реактивность с флагеллярным белком весом 41 кДа среди 58 контрольных образцов (41%). Частота такого реагирования оказалась значительно выше, чем с двумя другими штаммами.

Для выработки критериев позитивности в методе вестерн-блот для IgG антител мы использовали метод построения характеристических кривых для 11 IgG полос, обнаруженных у пациентов с различными стадиями бо-

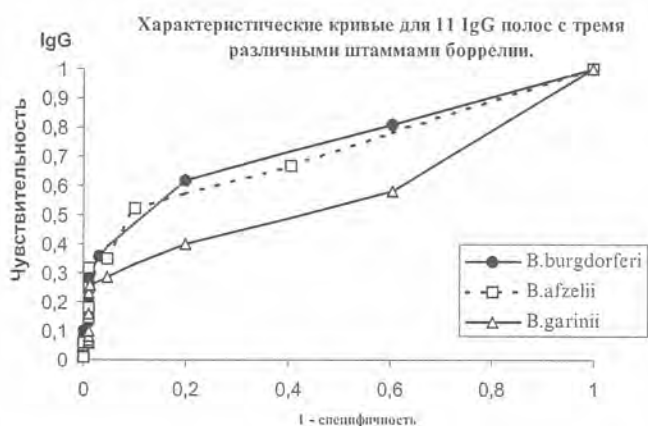
полос антител, поэтому наличие 3 специфичных антител явилось минимальным количеством для сохранения высокой специфичнос-

Таблица 1
Частота реактивности сывороток пациентов с болезнью Лайма и в контрольной группе с белками B.burgdorferi класса IgG (%).

kDa	Пациенты с БЛ (N-97)			Контрольная группа (N-145)		
	Bb*	Ba*	Bg*	Bb	Ba	Bg
18	6	12	12	0	1	3
23	6	7	15	1	1	8
28	10	21	6	1	10	1
30	9	7	11	1	7	10
37	6	6	20**	1	4	6
39	17	45**	30	2	1	5
41	44	44	40	9	13	40**
45	31	17	18	4	2	5
58	31	36	29	2	6	8
66	17	21	15	13	12	7
93	18	22	24	2	2	8

* - Bb - B.burgdorferi sensu stricto, Ba - B.afzelii, Bg - B.garinii

** - Статистическая значимость 0.001 отмечена среди пациентов с БЛ к белкам класса IgG весом 37 и 39 кДа и среди контрольной группы к белку 41 кДа.



лезни (рис.). Со всеми тремя штаммами зоны специфичности и чувствительности были практически одинаковыми как для 3, так и для 11

ти. В связи с тем, что штамм боррелии, вызвавшей в каждом конкретном случае инфицирование, клиницистам обычно неизвестен, мы считали предпочтительным разработку единых критериев для различных штаммов. В результате этого мы определили как обязательный позитивный результат ВБ для IgG антител наличие 3 из 11 полос молекулярным весом 18, 23, 28, 30, 37, 39, 41, 45, 58, 66, 93 кДа.

В таблице 2 представлены чувствительность и специфичность IgG ВБ у пациентов с различными клиническими проявлениями. Так, у 18% пациентов первой группы и у 39% четвертой группы выявлялись позитивные результаты ВБ при использовании Bb sensu stricto, при этом специфичность составила 99%. Абсолютно идентичная картина наблюдалась со штаммом B.garinii: 18 и 39% соответственно, при специфичности 93%. Используя штамм B.afzelii, позитивный результат не обнаружен у пациентов с локальной МЭ, однако определялся у 46% пациентов четвертой группы (поздние ар-

титры/артралгии). Специфичность при этом составила 97%. Таким образом, серопозитивность по IgG ВБ была выше у пациентов с поздней инфекцией и суставными проявлениями по сравнению с ранними стадиями болезни. В целом серопозитивность в используемом нами методе обнаружена у небольшого количества пациентов с БЛ.

Обсуждение.

ВБ используется повсеместно в серодиагностике БЛ, зачастую как окончательная "точка над и" при решении конкретных диагностических задач и выборе терапевтической

лечения циркуляцией трех штаммов. По мнению U. Hauser и B. Wilske, желательным является выбор одного штамма для диагностики, но в настоящее время это не представляется возможным. Эти авторы предприняли попытку выработать единые критерии для нескольких штаммов. Однако, столкнувшись с той же проблемой низкой чувствительности и специфичности, были вынуждены провести дифференцировку по штаммам [12]. Наши результаты по частоте серопозитивности среди пациентов с различными стадиями болезни согласуются с данными других авторов: спектр ан-

Таблица 2

Чувствительность и специфичность IgG вестерн-блота у пациентов с различными стадиями болезни Лайма (% позитивных результатов)

Группы исследованных	B.burgdorferi		B.afzelii		B.garinii	
	Чувств.	Специф.	Чувств.	Специф.	Чувств.	Специф.
1	18	99	0	97	18	93
2	25	99	25	97	25	93
3	23	99	39	97	32	93
4	39	99	46	97	39	93

тактики. Однако проблема эта в настоящее время далека от решения и остается одной из самых важных, так как в итоге обуславливает врачебную тактику.

Даже в регионах, где циркулирует лишь один штамм боррелии, например в США, существует ряд проблем, которые отягощают трактовку серологических исследований: 1) экспрессия Bb общих или перекрестно-реагирующих бактериальных антигенов; 2) индивидуальность гуморального ответа; 3) отсутствие стандартизации метода [6]. Последняя проблема считается решенной в США, хотя, по нашему мнению, с определенными допусками. Так, стандартизованными считаются только одобренные FDA (Food and Drug Administration) наборы для Bb. Тем не менее тестирование Коллегией американских патологов показало большое количество вариаций как в результатах, так и в их интерпретации. Последнее указывает на то, что, помимо вышеуказанных сложностей, определенную роль играет субъективный фактор [14].

По сути похожими являются сложности в трактовке этого метода в Европе, усугуб-

тител нарастает с длительностью болезни, а частота выявления антител значительно увеличивается при системных проявлениях болезни [10,12].

Помимо этого, было показано, что гуморальный ответ среди европейских пациентов с БЛ представляется более ограниченным по сравнению с американскими пациентами [9].

Дополнительным осложняющим фактором является то, что антибактериальная терапия, независимо от эффективности, может быстро и стойко абортировать образование антител. В этом случае даже при персистенции симптомов болезни антитела могут не выявляться. Мы предполагаем, что немалая часть негативных результатов, полученных среди пациентов с несомненной картиной позднего боррелиоза, обусловлена именно этим фактом.

Несмотря на различные штаммы, технические характеристики метода (применение различных гелей, моноклональных антител для идентификации и т.д.), разнообразные методики считывания (субъективные, денситометрические), мы можем констатировать, что полученные нами данные согласуются с современ-

ными представлениями об европейском боррелиозе, отражая сложности диагностики и закономерностей гуморального ответа при этой болезни. Предлагаемые нами критерии представляются адекватными для современного этапа развития методической базы серологической диагностики БЛ. Критерии могут быть рекомендованы для серологического диагноза и, в первую очередь, для распознавания поздних ревматических проявлений БЛ.

Выражаем искреннюю благодарность профессору Коренбергу Э.И. (Институт эпидемиологии и микробиологии им Н.Ф.Гамалеи) за предоставление отечественных штаммов боррелии.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Ананьева Л.П., Барскова В.Г., Скрипникова И.А. и соавт. Стадийное течение Лайм-боррелиоза у больных с мигрирующей эритемой. В сб. "Проблемы клещевых боррелиозов" под ред. проф. Коренберга Э.И. М., 1993, 66-73
2. Ананьева Л.П. Боррелиоз Лайма и его ревматические проявления. Автореф. докт. дисс. М., 1999.
3. Коренберг Э.И. Проблема болезни Лайма в России. В сб. "Проблемы клещевых боррелиозов" под ред. проф. Коренберга Э.И. М., 1993, 13-21
4. Лесняк О.М., Лайковская Е.Э., Чарнис М.Я. с соавт. Клинический спектр болезни Лайма в Свердловской области. Там же: 74-80.
5. Ananieva L.P., Barskova V.G., Nasonova V.A. Serum antibodies against *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia afzelii* and *Borrelia garinii* in Lyme borreliosis patients. Analysis by Immunoblot. 2nd European Symposium on Pathogenesis and Management of Tick-Born Diseases. Vienna, Austria, 1998, 28-30, 29
6. Baranton G, Postic D, Saint Girons I. Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* sp. nov. and group VS461 associated with Lyme borreliosis. Int. J. Syst. Bacteriol., 1992, 42, 378-383.
7. CDC. Lyme disease - United States. MMWR surveillance summary. 1993, 42, 345-50
8. CDC. Recommendation for test performance and interpretation from the Second National Conference on the serologic diagnosis of Lyme disease. MMWR 1995, 44(31), 590-1
9. Dressier F, Ackermann R., Steere A. Antibody responses to the three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* in European Lyme borreliosis. J. Infect. Dis., 1994, 169, 313-318.
10. Dressier F., Whalen J.A., Reinhardt B.N. Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. J. Infect. Dis., 1993, 167, 392-400
11. Golightly M.G. Lyme Borreliosis: Laboratory Consideration. Sem. Neurol., 1997, 17, 1, 11-17
12. Hauser U, Lehnert G, Lobentaizer R. Interpretation criteria for standardized Western Blots for three European species of *Borrelia burgdorferi sensu lato*. J. Clin. Microbiol., 1997, 35, 6, 1433-1444
13. Steere A. Lyme disease. N. Engl. J. Med., 1989, 321, 586-96
14. WSLH/CAP Lyme disease surveys. 1993.

Summary.

*There are currently no accepted criteria for positive Western blots in Russian patients with Lyme borreliosis. The purpose of the current study was to develop criteria for a positive IgG western-blot to aid particularly in the diagnosis of patients with joint manifestation of the disorder. Patients: 97 with Lyme disease, 145 - control subjects. IgG antibody responses were determined to 3 species of *B. burgdorferi sensu lato* by Western blotting, using blots prepared by manufacturer. The best discriminatory ability of test criteria was chained by requiring any 3 of 11 IgG bands, a definition that could be used with *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii* and *B. afzelii* strains. With these 3 antigen preparation, positive IgG blots were found in 0 to 18% of patients with localized erythema migrans of < 4 weeks duration, 23 to 39% of those with disseminated infection < 20 weeks duration, and in 39 to 46% of those with late arthritis/arthralgia of > 6 months duration the specificity was 93 to 99%. Thus, IgG Western blotting may bring greater specificity to serologic testing in Lyme borreliosis, but the sensitivity is limited.*

Key words: *Lyme disease. Western-blots, arthritis.*