

*A.E. Platonov¹, J. Koetsveld², O.A. Stukolova¹, A.S. Dolgova¹,
H.M. Kolyasnikova^{1,3}, M.G. Toporkova⁴, D.S. Sarkisyan⁵*

БАКТЕРИЦИДНОЕ ДЕЙСТВИЕ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА НА BORRELIA MIYAMOTOI, ВОЗБУДИТЕЛЯ ИКСОДОВОГО КЛЕЩЕВОГО БОРРЕЛИОЗА (ИКБ-БМ)

¹Центральный НИИ эпидемиологии, Москва; ²Academic Medical Centre, University of Amsterdam, the Netherlands; ³Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова, Москва; ⁴ООО МО «Новая больница», Екатеринбург; ⁵Ижевская государственная медицинская академия

Цель. Целью данной работы было изучение бактерицидного действия сыворотки крови человека на *Borrelia miyamotoi* in vitro. *Материалы и методы.* Спирохеты *B. miyamotoi*, штаммы HT31 и LB-2001, инкубировали в неиммунной сыворотке здоровых доноров (СЗД), в СЗД с инактивированной нагреванием системой комплемента, а также в образцах сыворотки крови переболевших ИКБ-БМ. Жизнеспособность (подвижность) боррелий после инкубации контролировали путем темнопольной микроскопии. Уровень сывороточных антител к специфическим белкам *B. miyamotoi* (ферменту GIpQ и поверхностным белкам Vlp15/16, Vlp18, Vsp1, Vlp5) измеряли с помощью специально разработанного планарного белкового иммуночипа. *Результаты.* Боррелии полностью сохраняют жизнеспособность в неиммунной СЗД, но их подвижность частично или полностью подавляется при добавлении сыворотки крови переболевших ИКБ-БМ или кроличьих антител к *B. miyamotoi*. Имобилизирующее действие иммунной сыворотки в существенной степени ингибируется при ее инактивации нагреванием, что указывает на опосредованность этого эффекта системой комплемента. *Заключение.* Антитело-зависимое комплемент-опосредованное бактерицидное действие сыворотки крови человека, вероятно, не является единственным, 100% эффективным механизмом защиты человека от инфекции *B. miyamotoi*, но требует поддержки со стороны клеточного иммунитета.

Журн. микробиол., 2018, № 1, С. 58—67

Ключевые слова: иксодовый клещевой боррелиоз, *Borrelia miyamotoi*, бактерицидное действие сыворотки, in vitro, антитела, система комплемента

*A.E. Platonov¹, J. Koetsveld², O.A. Stukolova¹, A.S. Dolgova¹,
N.M. Kolyasnikova^{1,3}, M.G. Toporkova⁴, D.S. Sarkisyan⁵*

BACTERICIDAL EFFECT OF HUMAN SERUM ON BORRELIA MIYAMOTOI, CAUSATIVE AGENT OF IXODES TICK-BORNE BORRELIOSIS (ITBB-BM)

¹Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia; ²Academic Medical Centre, University of Amsterdam, Netherlands; ³Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immunobiological Preparations, Moscow, ⁴Medical Association «New Hospital», Ekaterinburg, ⁵Izhevsk State Medical Academy, Russia

Aim. Our aim was to study the bactericidal effect of human serum on *Borrelia miyamotoi* in vitro. *Materials and methods.* *B. miyamotoi* spirochetes (strains HT31 and LB-2001) were incubated in non-immune serum of healthy donors (SHD) and in heat inactivated complement-depleted SHD, as well as in serum samples of the patients recovered from ITBB-BM. The viability, that is motility, of borrelia after incubation was investigated by dark-field microscopy. The levels of serum antibody to *B. miyamotoi*-specific proteins (GIpQ enzyme and four variable major proteins Vlp15/16, Vlp18, Vsp1, and Vlp5) were measured by specially designed plane protein microarray. *Results.* *Borrelia* fully retain their viability in non-immune SHD, but their motility is partially or completely suppressed by the addition of serum from ITBB-BM convalescents or rabbit antibodies to *B. miyamotoi*. The immobilizing effect of the immune serum is substantially inhibited by its heat-inactivation, which indicates that immobilizing effect is mediated by the complement system.

Conclusion. Antibody-dependent complement-mediated bactericidal action of human blood serum is probably not the only and 100% effective mechanism for human defense against *B. miyamotoi* infection, but requires support from cellular immunity.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 1, P. 58–67

Key words: ixodes tick-borne borreliosis, *Borrelia miyamotoi*, serum bactericidal activity, *in vitro*, antibodies, complement system

ВВЕДЕНИЕ

Иксодовый клещевой боррелиоз, вызванный *Borrelia miyamotoi* (ИКБ-БМ) — ранее неизвестное инфекционное заболевание, открытое в России [2, 18]. В отличие от «классического» иксодового боррелиоза — болезни Лайма (БЛ), вызываемой *B. burgdorferi sensu lato*, ИКБ-БМ представляет собой генерализованную инфекцию с преобладанием лихорадочного синдрома и возможностью преходящих нарушений функций печени, почек, сердца и других органов [1, 5, 6, 8]. У иммунокомпromетированных пациентов инфекция *B. miyamotoi* может становиться хронической и сопровождаться таким угрожающим жизни осложнением как менингоэнцефалит [13, 14].

Боррелии вида *B. miyamotoi* обнаруживаются повсеместно в иксодовых клещах, распространенных в зонах умеренного климата Евразии и Северной Америки, и генетически принадлежат к группе боррелий — возбудителей клещевых возвратных лихорадок (КВЛ) [17, 26]. При условии адекватной антибиотикотерапии рецидивов ИКБ-БМ не возникает; в естественных условиях, без антибиотикотерапии возможны, как и при КВЛ, новые приступы лихорадки через 1 — 2 недели [9]. Для понимания динамики инфекционного процесса при ИКБ и КВЛ необходимо, в первую очередь, ответить на ряд вопросов: что позволяет возбудителям в течение инкубационного периода успешно размножаться в крови и тканях организма человека, несмотря на сопротивление иммунной системы? Что происходит на стадии естественной, без антибиотикотерапии элиминации возбудителя в ходе выздоровления? Какие эффекторные звенья иммунитета критически необходимы для выздоровления? Почему выздоровление не всегда бывает полным и возможны рецидивы или хронизация боррелиозов? История изучения БЛ насчитывает более 30 лет, а КВЛ — даже более 100 лет, тем не менее, убедительных и полных ответов на сформулированные выше вопросы не получено. Предполагается, что вирулентные штаммы возбудителей КВЛ и БЛ защищены от бактериолитического действия системы комплемента (СК) млекопитающих, поскольку экспрессируют на своей поверхности ряд фактор Н-связывающих белков (Fhbp). Такие белки-липопротеины выявлены у *B. burgdorferi s.l.* (OspE, BbCRASPs, BaCRASPs), *B. hermsii* (BhCRASPs или FhbA) и других боррелий [4, 20, 21, 23]. В свою очередь, фактор Н и фактор Н-похожие белки хозяина способствуют инактивации фактора С3b, распаду С3-конвертазы и, тем самым, ингибируют сборку мембраноатакующих комплексов (МАК) комплемента на поверхности бактерий. Защитные в результате этой «молекулярной мимикрии», по крайней мере, от активации СК по альтернативному пути, боррелии размножаются и накапливаются в кровотоке, при КВЛ до таких высоких концентраций как 10^8 боррелий на мл крови [4]. Ряд экспериментов показывает, что Т-независимая продукция специфических IgM необходима и достаточна для защиты мышей от КВЛ [12]. При этом важными антигенами возбудителей

КВЛ являются вариабельные основные липопротеины наружной мембраны — variable major lipoproteins (VMPs), разделяемые на два семейства: variable small lipoproteins (Vsp) и variable large lipoproteins (Vlp). Vlp, в свою очередь, разделяются на подсемейства alpha, beta, gamma и delta. Антитела к VMPs потенциально могут быть протективными. Однако у возбудителей КВЛ от 26 до 80 вариантов генов Vsp и Vlp, хотя в каждый отдельный момент активен только ген, находящийся в специальном месте экспрессии на линейной плазмиде. Остальные варианты находятся на молчащих архивных плаزمиде, но в процессе рекомбинации могут заместить работающий ген [11, 24]. По мере того, как вырабатываются антитела к первому серотипу, количество боррелий в крови уменьшается, при возникновении нового удачного сероварианта боррелии вновь накапливаются в крови.

Сведения о взаимодействии нового возбудителя *B. miyamotoi* с иммунной системой человека практически отсутствуют. В заголовках двух публикаций сообщается, что боррелии вида *B. miyamotoi* являются комплемент-резистентными [22, 25], в третьей статье уточняется, что резистентность обеспечивается фактор Н-связывающим белком CbiA [19]. Это весьма неточное утверждение, поскольку реально в этих исследованиях показано только, что бактерицидное действие сыворотки крови человека не реализуется в условиях отсутствия анти-боррелиозных антител, то есть по механизму активации альтернативного и/или лектинового пути СК. В нашей работе рассматривается взаимодействие *B. miyamotoi* с сывороткой крови в более физиологических условиях, в первую очередь, при добавлении сыворотки переболевших ИКБ-БМ, богатой специфическими антителами к VMPs.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проведена на базе ООО МО «Новая больница» Екатеринбург и Республиканской клинической инфекционной больницы Удмуртской Республики в эпидемический сезон (июнь—июль) 2015 и 2016 гг. Критерием включения пациента было подозрение на клещевую инфекцию. Применялись как стандартные диагностические методы (определение IgM и IgG к боррелиям и вирусу клещевого энцефалита), так и оригинальные методики специфических ПЦР, выявляющих ДНК *B. miyamotoi* или *B. burgdorferi* s.l., описанные в деталях ранее [2, 18]. ИКБ-БМ диагностировался на основании детекции ДНК *B. miyamotoi* в крови больного при отсутствии лабораторных признаков иных инфекций. Образцы сыворотки крови больных ИКБ-БМ собирались во время лечения и на стадии реконвалесценции — через 1 и 3 месяца после начала заболевания и затем хранились и транспортировались в условиях глубокой заморозки до момента использования в эксперименте.

Для серологической дифференциации ИКБ, вызываемых *B. burgdorferi* s.l. и *B. miyamotoi*, предложено использовать антитела к ферменту глицерофосфодиэстер-фосфодиэстеразе (GlpQ), который не синтезируется видами *B. burgdorferi* s.l., но встречается у *B. miyamotoi* [17, 24, 26]. Разработанный в ЦНИИ эпидемиологии планарный белковый биочип включает белки-антигены как *B. burgdorferi* s.l., так и *B. miyamotoi* (GlpQ, Vlp15/16, Vlp18, Vsp1, Vlp5), для которых были получены генноинженерные конструкции, кодирующие антигенную область, фрагмент белка или полную последовательность белка. Антигены были экспрессированы в *Escherichia coli*, очищены методами аффинной и ионообменной хроматографии и нанесены на иммуночип/слайд с альдегидным покрытием 3D-Aldehyde Glass Slides (PolyAn, Германия). Учет результатов анализа после нанесения на иммуночип сыворотки крови больных

и вторичных антител к иммуноглобулинам человека проводили с помощью многоканального флуоресцентного сканера MarS (Ditabis, Германия), а обсчет, стандартизацию и интерпретацию результатов — с использованием специально разработанного программного обеспечения StarSky. Уровень специфических IgM и IgG характеризовали полуколичественным способом по величине стандартизованного оптического сигнала [10].

В работе использованы два штамма *V. miyamotoi* HT31 и LB-2001, из коллекции Академического медицинского центра, Амстердам. Штамм HT31 принадлежит к азиатскому генотипу и изолирован от клеща *Ixodes persulcatus* в Японии, получен из хранилища Центров по контролю заболеваемости, США. Штамм LB-2001, принадлежащий к американскому генотипу, получен из Йельского университета, ранее изолирован от клеща *Ixodes scapularis*. Штаммы первых пассажей (до десятого) хранились в условиях глубокой заморозки, для целей данной работы они подращивались в ранее разработанной специализированной среде МКР-FS [16, 25] при 33°C до окончания логарифмической фазы роста приблизительно через неделю при концентрации около 10⁷ боррелий/мл. После центрифугирования и отмывки свежей средой МКР-FS приготавливали суспензию боррелий, содержащую точно 10⁷ живых подвижных спирохет на мл (компонент 1 экспериментальной среды). Подсчет клеток и контроль их жизнеспособности проводили методом темнопольной микроскопии.

Экспериментальная среда состояла из двух-трех компонентов (табл.). В лунки с U-образным дном полипропиленового 96-луночного планшета до-

Подвижность и иммобилизация *V. miyamotoi* при инкубации в различных условиях

Номер п/п	Состав экспериментальной среды, в которой проводится инкубация боррелий			Доля подвижных боррелий (%), среднее±стандартное отклонение		
	Компонент 1 (сыворотка крови)	Компонент 2	Компонент 3 (штамм <i>V. miyamotoi</i>)	В начале инкубации	Через час инкубации	Через 3 часа инкубации
1	СЗД50	нет	LB-2001	95.1±2.4	91.6±1.9	90.1±1.5
2	ИН-СЗД50	нет	LB-2001	95.4±1.4	91.8±2.2	91.9±2.9
3	СЗД50	нет	HT31	90.7±1.9	86.7±3.2	85.3±3.5
4	ИН-СЗД50	нет	HT31	95.0±1.0	95.0±1.0	95.9±1.4
5	СЗД50	Анти- Ψ sp1 IgG, 100 мкг/мл	LB-2001	92.1±1.7	0.3±0.5	0.0
6	ИН-СЗД50	Анти- Ψ sp1 IgG, 100 мкг/мл	LB-2001	91.1±1.3	49.8±3.1	6.5±4.8
7	СЗД50	Анти- Ψ sp1 IgG, 20 мкг/мл	LB-2001	95.3±1.1	39.2±6.3	1.7±3.2
8	ИН-СЗД50	Анти- Ψ sp1 IgG, 20 мкг/мл	LB-2001	96.6±0.6	83.9±6.3	33.9±8.8
9	СЗД50	активированный зимозан, 0.05%	LB-2001	94.8±1.7	88.9±1.8	90.5±1.6
10	СЗД50	активированный зимозан, 0.05%	HT31	90.3±2.1	84.8±6.7	90.4±4.2
11	СЗД25	С-ИКБ-БМ, код MIR-4672-D2	HT31	96.7±0.8	68.6±4.3	58.0±4.9
12	СЗД25	С-ИКБ-БМ5, код MIR-4672-D2	HT31	96.7±0.8	92.9±2.9	71.7±1.7
13	ИН-СЗД25	ИН-С-ИКБ-БМ, код MIR-4672-D2	HT31	96.7±0.8	95.1±1.7	95.3±1.1
14	СЗД25	С-ИКБ-БМ, код SHU-7-3М	HT31	96.7±0.8	69.0±3.0	59.5±3.5
15	ИН-СЗД25	ИН-С-ИКБ-БМ, код SHU-7-3М	HT31	96.7±0.8	88.9±2.6	94.9±1.6
16	СЗД25	С-ИКБ-БМ, код SH1-3-1М	HT31	96.7±0.8	56.1±5.1	47.2±3.7
17	ИН-СЗД25	ИН-С-ИКБ-БМ, код SH1-3-1М	HT31	96.7±0.8	89.3±2.2	88.5±1.9

Примечание. СЗД50 — сыворотка крови здорового донора, 50%; СЗД25 — СЗД, 25%; ИН-СЗД50 — инактивированная нагреванием СЗД, 50%; ИН-СЗД25 — ИН-СЗД, 25%. С-ИКБ-БМ — сыворотка крови переболевшего ИКБ-БМ, взятая на стадии реконвалесценции, 25%. Код соответствует пациенту и времени взятия образца сыворотки. С-ИКБ-БМ5 — С-ИКБ-БМ, разведенная МКР-FS, 5%. ИН-С-ИКБ-БМ — инактивированная нагреванием С-ИКБ-БМ, 25%. Компонент 3 — суспензия боррелий в среде МКР-FS, 5x10⁶ на мл. Указаны финальные концентрации сыворотки, антител, зимозана и боррелий после их смешивания в составе экспериментальной среды инкубации. Жирным шрифтом выделены условия, в которых число подвижных боррелий ниже 70%.

бавляли компонент 1, сыворотку крови здорового донора (СЗД) без IgM и IgG к боррелиям. В отсутствии второго компонента объем компонента 1 составлял 50% от общего объема экспериментальной среды, то есть обычно 50 мкл. В некоторых опытах вместо СЗД использовали инактивированную нагреванием СЗД (ИН-СЗД). Известно, что после инактивации сыворотки нагреванием (56°C, 1 час) литическая активность СК равна нулю, в то время как большинство других белков, включая антитела, остаются интактными. В качестве 2 компонента мог быть использован раствор поликлональных кроличьих IgG к Vsp1 [24] в различных концентрациях в фосфатном буфере (ФБ) в объеме 5 мкл или для контроля эффекта этих антител просто ФБ 5 мкл. При этом объем компонента 1 уменьшали до 45 мкл. Еще в одном эксперименте компонентом 2 служила взвесь активированного зимозана в ФБ. Чаще всего в качестве компонента 2 как источник специфических антител использовали сыворотку крови переболевших ИКБ-БМ в объеме 25 мкл. При этом для стандартизации условий эксперимента (активности СК, биохимического состава сыворотки и т.п.) в экспериментальной среде присутствовал и компонент 1 — СЗД — в объеме 25 мкл. Третьим компонентом, также в объеме 50% от общего объема или 50 мкл, была суспензия боррелий. Таким образом, во всех экспериментальных условиях в начале эксперимента в лунке находилось 5×10^6 /мл спирохет, 90 — 97% из которых были подвижными.

После окончательного заполнения лунок планшет немедленно заклеивали и помещали в термостат для инкубации в микроаэробных условиях. Через 1 час и 3 часа инкубации из каждой лунки отбирали по 4 капли экспериментальной среды с боррелиями объемом 5 мкл и наносили по отдельности на предметное стекло под покровное стекло. Оценка доли подвижных и неподвижных боррелий проводилась немедленно методом темнопольной микроскопии независимым исследователем, не оповещенным о статусе изучаемого образца (контроль или опыт и т.п.). В каждой капле определяли состояние не менее 100 боррелий, как правило, в 5 — 6 полях зрения. Ранее было показано, что оценка числа подвижных боррелий в остром эксперименте, длящемся 1 — 3 часа, практически равноценна оценке способности боррелий к росту в аналогичных условиях в эксперименте, длящемся трое суток: иммобилизация 100% боррелий соответствует 100% ингибированию роста, иммобилизация 50% боррелий соответствует окончательной гибели 50% боррелий на более поздних стадиях инкубации и т.п. [15, 19]. Визуально первая стадия лизиса боррелий, следующая за иммобилизацией, выражается в нарушении строгой штопорообразной формы спирохет, их скрючивании, появлении многочисленных выпячиваний (blebs) наружной мембраны.

Все статистические расчеты и оценки проведены с помощью лицензионной программы IBM SPSS Statistics 19. Для оценки значимости различий распределений количественных и качественных переменных использовали стандартные непараметрические методы [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ

При инкубации в течение 1 — 3 часов в среде МКР-FS боррелии сохраняют подвижность; то же самое наблюдается и при инкубации в среде, содержащей 50% СЗД (табл. строки 1 и 3) или же 50% ИН-СЗД (строки 2 и 4). Добавление 100 мкг/мл IgG к Vsp1 приводит к быстрой и необратимой иммобилизации и лизису боррелий штамма LB-2001, которые экспрессируют именно этот VMP (строка 5); использование ИН-СЗД вместо СЗД замедляет, но не прекращает этот процесс (строка 6). При использовании меньшей кон-

центрации антител к Vsp1 (20 мкг/мл) иммобилизация в СЗД также существенно замедляется (строка 7), а иммобилизация в ИН-СЗД незначительна (строка 8) — через 3 часа и даже через 24 часа инкубации (данные не приводятся) часть боррелий сохраняет жизнеспособность. На штамм НТ31, не экспрессирующий белки семейства Vsp, антитела к Vsp1 не действуют (данные не приводятся).

Если в среде, содержащую СЗД и боррелии, добавляется активированный зимозан в количестве (0,05% по весу), достаточном для связывания и потребления присутствующих компонентов СК, значимой иммобилизации боррелий также не происходит (строки 9 и 10). Это значит, что отсутствует так называемый «эффект свидетеля», когда образующиеся в ходе активации СК растворимые МАК неспецифически связываются с соседними клетками, вызывая их повреждение.

Наибольшее число экспериментов поставлено в условиях, когда в среде инкубации присутствуют 25% СЗД, не содержащей антител к боррелиям (как стандартизованный источник компонентов СК), и 25% сыворотки крови переболевших ИКБ-БМ, взятой на стадии реконвалесценции, до 3 месяцев после начала заболевания (как источник специфических противоборрелиозных антител). Сыворотку крови, взятую во время лечения, нельзя было использовать, так как она содержала антибиотик. Как и ожидалось, эффект различных образцов сыворотки переболевших варьировал в широком диапазоне: от 0 до 100% иммобилизованных спирохет. В среднем через 1 час инкубации $70 \pm 15\%$ (среднее \pm стандартное отклонение, $M \pm SD$) спирохет штамма НТ31 были подвижными (изучено 20 образцов от 14 больных). Через 3 часа эта величина менялась незначительно — до $66 \pm 19\%$.

В табл. приведено несколько примеров иммобилизирующего действия сыворотки крови переболевших (строки 11, 14, 16), его ингибирования при предварительной инактивации СК нагреванием (строки 13, 15, 17) или при разбавлении сыворотки переболевших (строка 12).

На основании данных табл. возможны многочисленные сравнения проявлений эффекта иммобилизации в различных условиях. Для краткости величины уровня значимости всех подобных сравнений не приводятся. При рассмотрении табл. можно воспользоваться «правилом двух сигм»: если диапазоны $M_1 - 2xSD_1$ и $M_2 + 2xSD_2$ не пересекаются, то величины M_1 и M_2 заведомо различны ($p < 0,05$).

Из 20 образцов сыворотки, исполь-

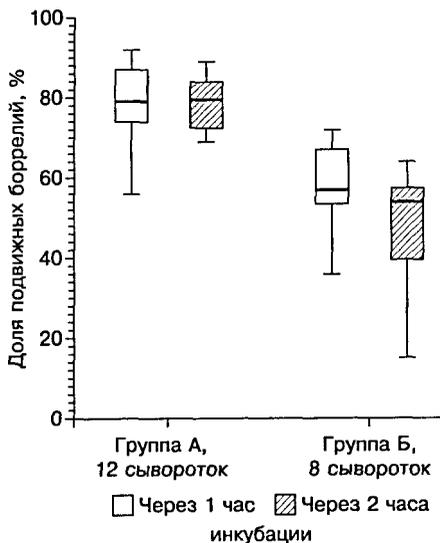


Рис. 1. Влияние содержания IgM к VMPs на иммобилизацию *V. miyamotoi*.

Ось ординат — доля подвижных боррелий штамма НТ31 после 1 и 3 часов инкубации в смеси образцов сыворотки крови переболевших ИКБ-БМ (компонент 2) и сыворотки крови здорового донора (компонент 1). Группа А — образцы сыворотки крови переболевших ИКБ-БМ, не содержащие IgM к VMP или содержащие антитела только к одному из 4 VMPs; Б — образцы сыворотки крови переболевших ИКБ-БМ, содержащие IgM к двум или более из 4 VMPs. Достоверность различия между группами А и Б по критерию Манна-Уитни $p = 0,0007$ и $0,00002$ для 1 и 3 часов инкубации соответственно.

зованных в опытах со штаммом НТ31, 15 содержали IgM к G1pQ и 14 — IgG; только в двух образцах отсутствовали и IgM, и IgG. Однако ни наличие, ни уровень антител к этому внутриклеточному ферменту не коррелировали с иммобилизующим действием сыворотки. Также эффект сыворотки переболевших не коррелировал и с уровнем IgM или IgG к каждому из 4 VMPs по отдельности. Влияние IgM (но не IgG) к VMPs проявлялось следующим образом: 14 образцов сыворотки содержали IgM к V1p15/16, 9 к V1p5, по 4 образца — антитела к V1p18 или Vsp1. При этом 6 использованных образцов не содержало антител ни к одному из 4 VMPs, 6 — только антитела к V1p15/16, и 2, 4 и 2 образца содержали IgM к двум, трем или 4 VMPs соответственно. Иммобилизующий эффект был значимо выше у образцов, содержащих антитела к 2 и более VMPs (рис. 1) и коррелировал с суммарной концентрацией IgM к VMPs (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты позволяют прийти к некоторым выводам и гипотезам, пока предварительным, поскольку наша работа является первым исследованием такого типа. Как и некоторые другие, хотя и не все, патогенные боррелии [19, 22, 25] *B. miyamotoi* успешно выживают в неиммунной сыворотке крови человека. Это означает, что активация СК по альтернативному и лектиновому пути и последующая сборка МАК на поверхности боррелий ингибируются, вероятно, за счет присутствия специальных белков, отвечающих за «молекулярную мимикрию» [4, 21, 23]. При таких генерализованных инфекциях, как ИКБ-БМ, активация СК может идти не только на поверхности собственно бактерий, но и на поверхности эндотелия сосудов и клеток крови. Активированные компоненты СК гипотетически могли бы атаковать боррелии за счет «эффекта свидетеля» (bystander lysis), однако в опытах с активированным зимозаном нами подобного явления не обнаружено.

Специфические антитела способны инициировать иммобилизацию и гибель *B. miyamotoi*, судя по всему, двумя способами. Первый способ не требует активации СК и реализуется при очень высоких, практически не физиологических концентрациях антител, заключаясь, по-видимому, в нарушении структуры липидной наружной мембраны. Второй способ предполагает активацию СК по классическому пути и образование МАК, поскольку не функционирует при «декомплементации» сыворотки нагреванием. Эффект антител дозозависим и снижается при разбавлении сыворотки как источника антител. При анализе связи содержания IgM и IgG к специфическим белкам *B. miyamotoi* (VMPs и G1pQ) и иммобилизующего действия конкретного образца сыворотки на штамм НТ31 обращает на себя внимание несколько обстоя-

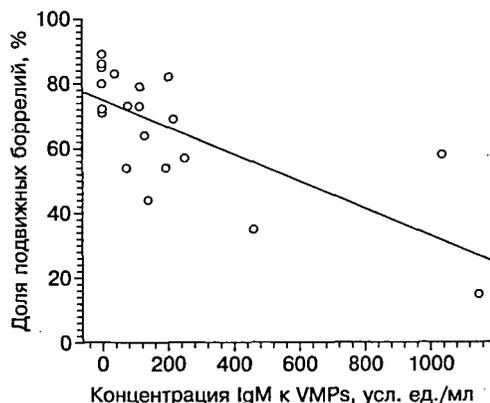


Рис. 2. Влияние содержания IgM к VMPs на иммобилизацию *B. miyamotoi*.

Ось ординат — доля подвижных боррелий штамма НТ31 после 3 часов инкубации в смеси образцов сыворотки крови переболевших ИКБ-БМ (компонент 2) и сыворотки крови здорового донора (компонент 1). Ось абсцисс — суммарный уровень антител к 4 VMPs (V1p15/16, V1p5, V1p18 и Vsp1). Кружки представляют результаты отдельных экспериментов с 20 образцами сыворотки крови переболевших ИКБ-БМ, линия — линейная аппроксимация взаимосвязи, коэффициент корреляции Спирмена 0,70, $p=0,001$.

тельств. На фоне наличия IgM не удается выявить заметного влияния присутствия IgG в образце. В этой связи, планируется изучить эффект IgG с использованием «поздних» образцов, взятых спустя год и позже от начала заболевания. Антитела к GlpQ, хотя и являются хорошим диагностическим серомаркером инфекции ИКБ-БМ, вероятно, слабо участвуют в иммобилизующем действии сыворотки и не являются протективными. Эффект антител к VMPs максимален при их высокой концентрации и в большей степени выражен при синэргичном действии антител к нескольким VMPs, чем при воздействии только антител к наиболее распространенному в изученных условиях VMP, то есть к Vp15/16. Примечательно, что при анализе клинических проявлений ИКБ-БМ выясняется, что тяжесть заболевания в большей степени коррелирует также с суммарным количеством антител к VMPs, а не с уровнем антител к отдельным VMP [Платонов А.Е. и др., 2017].

Теоретически рассуждая, полное выздоровление, хотя бы и после нескольких приступов ИКБ, должно сопровождаться полной и окончательной элиминацией боррелий из организма. В наших экспериментах даже в самых «бактерицидных» образцах сыворотки переболевших сохраняется некоторое количество жизнеспособных, подвижных боррелий. Можно сформулировать ряд объяснений этому факту. Во-первых, у всех наших больных выздоровление было достигнуто путем ранней антибиотикотерапии. Возможно, при этом продукция достаточного количества антител не запускается. Во-вторых, «бактерицидное» действие сыворотки может быть крайне узкоспецифичным, то есть 100% эффект будет достигаться только против штамма, вызвавшего заболевание, или «очень похожих» изолятов, а не против лабораторных штаммов HT31 и LB-2001. Предварительные опыты с клиническими изолятами *B. miyamotoi*, которые удалось получить [7, 16], свидетельствуют в пользу этого предположения. В-третьих, следует ожидать синэргичного действия защитных сил организма против генерализованной инфекции ИКБ-БМ: в элиминации *B. miyamotoi* могут принимать участие не только антитела и СК, но и фагоциты крови, резидентные макрофаги, дендритные клетки. В любом случае, исследование взаимодействия различных компонентов иммунной системы с *B. miyamotoi* должно быть продолжено и расширено в контексте патогенеза этой новой, практически неизученной инфекции.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 15-15-00072). Авторы признательны медицинскому персоналу ООО МО «Новая больница» Екатеринбург и Республиканской клинической инфекционной больницы Удмуртской Республики за помощь в проведении исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Багаутдинова Л.И., Платонов А.Е., Сарксян Д.С., Стуколова О.В., Шипулин Г.А., Малеев В.В., Дударев М.В. Катамнез больных иксодовыми клещевыми боррелиозами, вызванными *Borrelia miyamotoi* или *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Терапевтический архив. 2016, 88 (11): 43-54.
2. Карань Л.С., Колясникова Н.М., Махнева Н.А. Топоркова М.Г., Надеждина М.В., Есаулкова А.Ю., Романенко В.В., Арумова Е.А., Платонов А.Е., Малеев В.В. Применение ПЦР в режиме реального времени для диагностики различных клещевых инфекций. Журн. микробиол. 2010, 3: 72-77.
3. Платонов А.Е. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы. М., Издательство РАМН, 2000.
4. Платонов А.Е., Малеев В.В., Карань Л.С. Боррелиозные возвратные лихорадки: забытые и новые. Терапевтический архив. 2010, 82 (11): 74-80.
5. Платонов А.Е., Сарксян Д.С., Малеев В.В. Применение метода «дерева решений» для

- построения алгоритма дифференциальной диагностики природно-очаговых инфекций. *Терапевтический архив*. 2013, 85 (11): 21-26.
6. Платонов А.Е., Сарксян Д.С., Карань Л.С., Шипулин Г.А., Гордыгина Е.В., Малинин О.В., Малеев В.В. Состояние системы свертывания крови и микроциркуляторные нарушения при иксодовом клещевом боррелиозе, вызванном *Borrelia miyamotoi*. *Терапевтический архив*. 2015, 87 (11): 26-32.
 7. Платонов А.Е., Koetsveld J., Колясникова Н.М., Сарксян Д.С., Топоркова М.Г., Шипулин Г.А., Novius J.W. Микробиологическое подтверждение этиологии «иксодового клещевого боррелиоза в безэритемной форме» — инфекции, вызываемой *Borrelia miyamotoi*. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2017, 92 (1): 29-35.
 8. Сарксян Д.С., Платонов А.Е., Карань Л.С., Малинин И.Е., Халитова Л.И., Шахов В.И., Дударев М.В., Малинин О.В., Малеев В.В. Клинические особенности «нового» клещевого боррелиоза, вызываемого *Borrelia miyamotoi*. *Терапевтический архив*. 2012, 84 (11): 34-41.
 9. Сарксян Д.С., Малеев В.В., Платонов А.Е., Платонова О.В., Карань Л.С. Рецидивирующее (возвратное) течение заболевания, вызванного *Borrelia miyamotoi*. *Терапевтический архив*. 2015, 87 (11): 18-25.
 10. Стуколова О.А., Колясникова Н.М., Сарксян Д.С., Топоркова М.Г., Koetsveld J., Карань Л.С., Черкашина А.С., Маркелов М.Л., Долгова А.С., Novius J.W., Шипулин Г.А., Платонов А.Е. Разработка и использование планарного белкового биочипа для серологической диагностики клещевого боррелиоза, вызванного *Borrelia miyamotoi*. В: Молекулярная диагностика 2017. Под ред. Покровского В.И. Тамбов, ООО фирма «Юлис», 2017, 2: 151-152.
 11. Barbour A.G. Multiple and diverse vsp and vlp sequences in *Borrelia miyamotoi*, a hard tick-borne zoonotic pathogen. *PLoS One*. 2016, 11 (1): e0146283.
 12. Colombo M.J., Alugupalli K.R. Complement factor H-binding protein, a putative virulence determinant of *Borrelia hermsii*, is an antigenic target for protective B1b lymphocytes. *J. Immunol*. 2008, 180 (7): 4858-4864.
 13. Gugliotta J.L., Goethert H.K., Berardi V.P., Telford S.R. Meningoencephalitis from *Borrelia miyamotoi* in an immunocompromised patient. *New Engl. J. Med*. 2013, 368 (3): 240-245.
 14. Novius J.W., de Wèver B., Sohne M. et al. A case of meningoencephalitis by the relapsing fever spirochaete *Borrelia miyamotoi* in Europe. *Lancet*. 2013, 382 (9892): 658.
 15. Koetsveld J., Draga R.O.P., Wagemakers A. et al. In vitro susceptibility of the relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi* to antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2017, Jul 3. doi: 10.1128/AAC.00535-17.
 16. Koetsveld J., Kolyasnikova N.M., Wagemakers A. et al. Development and optimization of an in vitro cultivation protocol allows for isolation of *Borrelia miyamotoi* from patients with hard tick-borne relapsing fever. *Clin. Microbiol. Infect*. 2017, 23 (7): 480-484.
 17. Krause P.J., Fish D., Narasimhan S., Barbour A.G. *Borrelia miyamotoi* infection in nature and in humans. *Clin. Microbiol. Infect*. 2015, 21 (7): 631-639.
 18. Platonov A.E., Karan L.S., Kolyasnikova N.M. et al. Humans infected with the relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia. *Emerg. Infect. Dis*. 2011, 17 (10): 1816-1822.
 19. Rottgerding F., Wagemakers A., Koetsveld J. et al. Immune evasion of *Borrelia miyamotoi*: CbiA, a novel outer surface protein exhibiting complement binding and inactivating properties. *Sci. Rep*. 2017, 7 (1): 303.
 20. Schott M., Grosskinsky S., Brenner C. et al. Molecular characterization of the interaction of *Borrelia parkeri* and *Borrelia turicatae* with human complement regulators. *Infect. Immun*. 2010, 78 (5): 2199-2208.
 21. Stone B.L., Brissette C.A. Host immune evasion by Lyme and relapsing fever *Borreliae*: findings to lead future studies for *Borrelia miyamotoi*. *Front. Immunol*. 2017, 8: 12.
 22. Teegler A., Herzberger P., Margos G. et al. The relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi* resists complement-mediated killing by human serum. *Ticks Tick Borne Dis*. 2014, 5 (6): 898-901.
 23. Tsao J.I. Reviewing molecular adaptations of Lyme borreliosis spirochetes in the context of reproductive fitness in natural transmission cycles. *Vet. Res*. 2009, 40 (2): 36.

24. Wagemakers A., Koetsveld J., Narasimhan S. et al. Variable major proteins as targets for specific antibodies against *Borrelia miyamotoi*. *J. Immunol.* 2016, 196 (10): 4185-4195.
25. Wagemakers A., Oei A., Fikrig M.M. et al. The relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi* is cultivable in a modified Kelly-Pettenkofer medium, and is resistant to human complement. *Parasit. Vectors* 2014, 7: 418.
26. Wagemakers A., Staarink P.J., Sprong H., Novius J.W. *Borrelia miyamotoi*: a widespread tick-borne relapsing fever spirochete. *Trends Parasitol.* 2015, 31 (6): 260-269.

Поступила 21.08.17

Контактная информация: Платонов Александр Евгеньевич, д.б.н., проф.,
111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3а, р.т. (495) 976-96-46

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

Г.Т.Урядова, Е.А.Горельникова, Н.А.Фокина, А.С.Долмашкина, Л.В.Карпунина

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ НА СИНТЕЗ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ МАКРОФАГАМИ МЫШЕЙ ПРИ ФАГОЦИТОЗЕ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова

Цель. Изучение влияния экзополисахаридов (ЭПС) молочнокислых кокков на цитокиновую активность макрофагов мышей при фагоцитозе *in vitro* *Staphylococcus aureus* 209-Р. *Материалы и методы.* В работе использовали ЭПС *Streptococcus thermophilus* и *Lactococcus lactis* B-1662. На 1, 3, 5 и 7 выделяли альвеолярные (АМФ) и перитонеальные (ПМФ) макрофаги и моделировали процесс фагоцитоза *in vitro*. Через 30 минут, 1, 6 и 24 часа определяли содержание провоспалительных цитокинов ИЛ-1 α и ФНО- α . *Результаты.* ЭПС оказывали неоднородное влияние на продукцию цитокинов. Наибольшее действие на синтез ИЛ-1 α и ФНО- α оказывал ЭПС *S. thermophilus*. *Заключение.* Результаты исследований позволяют говорить о возможности использования ЭПС *S. thermophilus* в качестве профилактического иммуностимулятора для коррекции цитокинового статуса животных.

Журн. микробиол., 2018, № 1, С. 67—71

Ключевые слова: экзополисахариды, цитокины, фагоцитоз, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* B-1662

Г.Т.Урядова, Е.А.Горельникова, Н.А.Фокина, А.С.Долмашкина, Л.В.Карпунина

EFFECT OF EXOPOLISACCHARIDES OF LACTIC ACID BACTERIA ON THE SYNTHESIS OF PROINFLAMMATORY CYTOKINES BY MACROPHAGIC MICE IN PHAGOCYTOSIS OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Vavilov State Agrarian University, Saratov, Russia

Aim. Study of the effect of exopolysaccharides (EPS) of lactic acid cocci on cytokine activity of macrophages of mice with phagocytosis *in vitro* *Staphylococcus aureus* 209-Р. *Materials and methods.* The EPS of *Streptococcus thermophilus* and *Lactococcus lactis* B-1662 was used in the work. At 1, 3, 5 and 7, AMP and PMP were isolated and the phagocytosis process was modeled *in vitro*. After 30 minutes, 1, 6 and 24 hours, the content of pro-inflammatory cytokines IL-1 α and TNF- α was determined. *Results.* EPSs had an ambiguous effect on the production of cytokines. The greatest effect on the synthesis was provided by EPS of *S. thermophilus*. *Conclusion.* The results of the study allow us to talk about the possibility of using EPS of *S. thermophilus* as a preventive immunomodulator for correction of the cytokine status of animals.