

высокого уровня безработицы и внешней трудовой миграции. Рост частных животноводческих хозяйств, увеличение количества населения, имеющего скот в личных подворьях, преимущественно стойловое содержание животных, отсутствие государственного регулирования в сфере животноводства и низкое качество профилактических мероприятий приводят к формированию эпизоотических очагов бруцеллеза и инфицированию людей в них.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Агентство по статистике при президенте Республики Таджикистан. Режим доступа: <http://www.stat.tj/ru/database/socio-demographic-sector>.
2. Доклад о человеческом развитии в Центральной Азии. В будущее без барьеров. Региональное бюро ПРООН по странам Европы и Содружества Независимых Государств, 2005. Режим доступа: [http://www.un.org/ru/development/hdr/central\\_asia\\_2005.pdf](http://www.un.org/ru/development/hdr/central_asia_2005.pdf).
3. Желудков М.М. Бруцеллез в России: современная эпидемиология и лабораторная диагностика. Автореф. дис. докт. мед. наук. М., 2009.
4. Панарин С.А. Перспективы миграции коренных народов Центральной Азии в Россию: основные стимулы и ограничители. Сб. науч. трудов. Новосибирск, 2003.
5. Турдиев Ш.А. Усовершенствование мер борьбы с бруцеллезом мелкого рогатого скота в Республике Таджикистан. Автореф. дис. докт. биол. наук. Казань, 2013.
6. Черкасский Б.Л. Руководство по общей эпидемиологии. М., Медицина, 2001.
7. Corbell M.J. Brucellosis in humans and animals. WHO, FAO, OIE, 2006.
8. Mathers C., Vos Th., Lopez, A. et al. National burden of disease studies: a practical guide. WHO, 2001.
9. Pappas G., Papadimitriou P., Akritidis N. et al. The new global map of human brucellosis. Lancet. Infectious diseases. 2006, 6: 91-99.
10. Ward D., Jackson, R., Karomatullo H. et al. Brucellosis control in Tajikistan using Rev 1 vaccine: change in seroprevalence in small ruminants from 2004 to 2009. Veterinary Record. 2012, 170 (4): 100-106.

Поступила 07.12.15

Контактная информация: Симонова Елена Геннадиевна, д.м.н., проф., 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр.2, р.т. (495)687-40-35

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*В.С.Караваяев<sup>1</sup>, Е.С.Олейникова<sup>1,2</sup>, М.Ш.Азиев<sup>2</sup>, А.Б.Беклемишев<sup>1</sup>*

#### ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РЕКОМБИНАНТНОГО ХИМЕРНОГО ПОЛИПЕПТИДА OspC<sub>gar+afz</sub> ИЗОЛЯТОВ BORRELIA GARINII И V.AFZELII

<sup>1</sup> НИИ биохимии, Новосибирск; <sup>2</sup> ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», п. Кольцово, Новосибирская область

**Цель.** Сравнительное исследование антигенных свойств рекомбинантных белков OspC<sub>gar</sub> и OspC<sub>afz</sub> и рекомбинантного химерного полипептида OspC<sub>gar+afz</sub>, содержащего аминокислотные последовательности зрелых иммунодоминантных белков OspC западно-сибирских изолятов *Borrelia garinii* (OspC<sub>gar</sub>) и *V.afzelii* (OspC<sub>afz</sub>), и оценка возможности их использования в качестве антигенов при создании тест-систем для серодиагностики Лайм-боррелиоза (ЛБ) на территории Западной Сибири. **Материалы и методы.** Рекомбинантный химерный полипептид OspC<sub>gar+afz</sub> и рекомбинантные зрелые белки OspC<sub>gar</sub> и OspC<sub>afz</sub>, полученные экспрессией соответствующих генов в клетках *Escherichia coli*, очищали аффинной хроматографией на колонке с Ni-NTA сефарозой CL-6B и исследовали методом ИФА на способность связывать антитела сывороток больных ЛБ. **Результаты.** Показано различие в чувствительности определения методом ИФА специфических к боррелиям IgM и IgG в сыворотке крови больных ЛБ с локализованной стадией заболевания при использовании в качестве антигенов OspC<sub>gar</sub>, OspC<sub>afz</sub> и химера OspC<sub>gar+afz</sub>.

Установлено, что химерный антиген  $OspC_{gar+afz}$  проявлял более высокую антигенную активность, чем в отдельности каждый из антигенов  $OspC_{gar}$  или  $OspC_{afz}$ . **Заключение.** Результаты исследования позволяют рассматривать рекомбинантный химерный полипептид  $OspC_{gar+afz}$  как возможный компонент при создании тест-систем для серодиагностики ЛБ на территории Западной Сибири.

Журн. микробиол., 2016, № 3, С. 37—44

Ключевые слова: Лайм-боррелиоз, рекомбинантные белки  $OspC$ , *Borrelia burgdorferi* s.l., ИФА анализ, серодиагностика

V.S.Karavaev<sup>1</sup>, E.S.Oleinikova<sup>1,2</sup>, M.Sh.Azaev<sup>2</sup>, A.B.Beklemishev<sup>1</sup>

## IMMUNOCHEMICAL ANALYSIS OF RECOMBINANT CHIMERIC POLYPEPTIDE $OspC_{gar+afz}$ OF *BORRELIA GARINII* AND *B. AFZELII* ISOLATES

<sup>1</sup>Research Institute of Biochemistry, Novosibirsk; <sup>2</sup>State Scientific Centre of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia

**Aim.** Comparative study of antigenic properties of recombinant proteins  $OspC_{gar}$  and  $OspC_{afz}$  and recombinant chimeric polypeptide  $OspC_{gar+afz}$ , that contains amino acid sequences of mature immune dominant  $OspC$  proteins of West-Siberian isolates of *Borrelia garinii* ( $OspC_{gar}$ ) and *B. afzelii* ( $OspC_{afz}$ ), and evaluation of possibility of their use as antigens during creation of test-systems for serodiagnostics of Lyme borreliosis (LB) on the territory of Western Siberia. **Materials and methods.** Recombinant chimeric polypeptide  $OspC_{gar+afz}$  and recombinant mature proteins  $OspC_{gar}$  and  $OspC_{afz}$ , obtained by expression of the corresponding genes in *Escherichia coli* cells, purified by affinity chromatography in Ni-NTA-sepharose CL-6B and studied by EIA method for the ability to bind antibodies from sera of LB patients. **Results.** A difference in sensitivity of determination by EIA method of specific IgM and IgG against borreliae in blood sera of LB patients with localized stage of the disease during use of  $OspC_{gar}$ ,  $OspC_{afz}$  and  $OspC_{gar+afz}$  chimeric antigens was shown. Chimeric antigen  $OspC_{gar+afz}$  was established to show higher antigenic activity compared with each of the  $OspC_{gar}$  or  $OspC_{afz}$  antigens separately. **Conclusion.** The results of the study allow to examine the recombinant chimeric polypeptide  $OspC_{gar+afz}$  as a possible component during creation of test-systems for serodiagnostics of LB on the territory of West Siberia.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 3, P. 37—44

Key words: Lyme borreliosis,  $OspC$  recombinant proteins, *Borrelia burgdorferi* s.l., EIA analysis, serodiagnostics

## ВВЕДЕНИЕ

Лайм-боррелиоз (ЛБ) — наиболее распространенное зоонозное природно-очаговое заболевание в странах Европы, Азии и Северной Америки, связанное с клещами рода Ixodes. Возбудителями ЛБ у человека являются спирохеты, относящиеся к комплексу *Borrelia burgdorferi sensu lato* (s.l.). Возбудители боррелиозов неоднородны в своей генетической основе. По отличиям в нуклеотидных последовательностях ДНК боррелий выделяют 18 геновидов спирохет, входящих в состав комплекса *Borrelia burgdorferi* s.l., из которых преимущественно только 3 геновида (*B. burgdorferi sensu stricto*, s.s.), *B. garinii* и *B. afzelii*) являются патогенными для человека [15]. В России ЛБ связан, в основном, с двумя геновидами боррелий — *B. garinii* и *B. afzelii*, которые являются основными сочленами боррелиозных паразитарных систем [4].

По уровню заболеваемости и тяжести клинического течения ЛБ представляет собой одну из наиболее актуальных проблем современной инфекционной пато-

логии. По данным официальной статистики, ежегодно в течение последних 10 лет количество заболевших ЛБ в России колеблется от 7 до 9 тысяч. При этом большая часть случаев данного заболевания регистрируется на основе эпидемиологического анамнеза (присасывание клеща) и наличия клинической симптоматики (мигрирующая эритема). Установление клинического диагноза представляет определенные трудности из-за полиморфизма клинических проявлений с поражением многих органов и систем и органных поражений при ЛБ [12], а также наличием сопутствующих инфекций, возбудители которых переносятся иксодовыми клещами (анеплазмоз, бабезиоз, вирусный клещевой энцефалит и другие) [18]. Диагностика ЛБ обычно основывается на клинических признаках, но часто требует обязательного подтверждения лабораторными методами. В клинической практике основным серологическим тестом на ЛБ является метод иммуноферментного анализа с использованием различных комбинаций высокоспецифичных иммунодоминантных белков боррелий или их полипептидных фрагментов, не содержащих участков аминокислотной цепи, гомологичных антигенным детерминантам других микроорганизмов [8, 18]. Серодиагностика ЛБ существенно осложняется высокой генетической гетерогенностью возбудителей и, как следствие этого, антигенными отличиями между изолятами боррелий, циркулирующими в различных географических регионах.

Известно, что диагностическая ценность препаратов во многом определяется антигенами, используемыми в качестве иммуносорбента. Многие исследователи для улучшения серодиагностики Лайм-боррелиоза предлагают использовать в составе диагностических тестов антигены, свойственные геновидам *B.burgdorferi* s.l., распространенным в конкретном регионе [3, 7, 14].

Принципиально новым подходом по повышению диагностической чувствительности и специфичности лабораторных методов (иммуноферментного анализа, вестерн-блот анализа и иммунохроматографического анализа) является получение и использование для диагностики ЛБ полипептидов, содержащих эпитопы различных гомологичных или гетерологичных иммунодоминантных белков спирохет комплекса *B.burgdorferi* s.l. [8, 9, 18].

Цель настоящей работы — исследование антигенных свойств рекомбинантного химерного полипептида  $OspC$  ( $OspC_{gar+afz}$ ), содержащего аминокислотные последовательности полноразмерных зрелых иммунодоминантных белков  $OspC$  западно-сибирских изолятов *B.garinii* ( $OspC_{gar}$ ) и *B.afzelii* ( $OspC_{afz}$ ).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве антигенов для ИФА использовали рекомбинантный химерный полипептид  $OspC_{gar+afz}$ , а также рекомбинантные белки  $OspC$  геновида *B.garinii* подгруппы 20047<sup>T</sup> ( $OspC_{gar}$ ) и  $OspC$  геновида *B.afzelii* ( $OspC_{afz}$ ) с молекулярной массой 40,8; 20 и 19 кДа, соответственно. Изоляты спирохет были получены из клещей, отловленных в лесопарковой зоне Новосибирска [5]. Препараты ДНК изолятов были использованы для амплификации методом ПЦР кодирующих областей генов белков  $OspC_{gar}$  и  $OspC_{afz}$ . Ампликоны генов  $OspC_{gar}$  и  $OspC_{afz}$  и химерный ген  $OspC_{gar+afz}$  клонировали в клетках *E.coli* штамма BL21(DE3) в составе модифицированного экспрессирующего вектора pETm, как описано ранее [1, 6]. Выделение и очистку рекомбинантных белков осуществляли с помощью аффинной хроматографии лизата клеток *E. coli* на колонке с Ni-NTA сефарозой CL-6B. Количество белка определяли методом Лоури, используя для построения калибровочной кривой бычий сывороточный альбумин и IgG собаки. Чистота рекомбинантных белков по данным SDS составляла не менее 90%. Антигены хранили в буферном растворе, содержащем 10 мМ Трис-HCl, pH 7,5; 300 мМ NaCl; 20 мМ 2-меркаптоэтанол и 0,05%  $NaN_3$ .

В работе использовали панель положительных сывороток (n=48), состоящую

из сывороток крови больных ЛБ с локализованной стадией заболевания. Образцы сывороток больных ЛБ были получены из инфекционной клинической больницы №1 и областного диагностического центра Новосибирска. Диагноз ЛБ был установлен на основе анамнеза (укус клеща), наличия мигрирующей эритемы, данных клинического обследования. Диагноз ЛБ лабораторно подтвержден ИФА с помощью коммерческих иммуноферментных тест-систем «ЛаймБест-IgM» и «ЛаймБест-IgG» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск). При комплексном исследовании сывороток больных ЛБ методом ИФА не обнаружено специфических иммуноглобулинов класса М или G к спирохетам *Treponema pallidum* и вирусу клещевого энцефалита. Образцы сывороток собраны в период с 3 по 8 неделю после начала заболевания. Для определения неспецифических перекрестных реакций использовали панель отрицательных сывороток, включающую сыворотки здоровых доноров ( $n=30$ ), больных сифилисом ( $n=20$ ) и ревматоидным артритом ( $n=12$ ). Все сыворотки до исследования хранили при температуре минус  $70^{\circ}\text{C}$ .

Для оценки антигенной активности и специфичности  $\text{OspC}_{\text{gar}+\text{afz}}$ ,  $\text{OspC}_{\text{gar}}$  и  $\text{OspC}_{\text{afz}}$  использовали метод твердофазного иммуноферментного анализа. Постановку IgM-ИФА и IgG-ИФА осуществляли в оптимальных для каждого из антигенов режимах по ранее описанной методике [2]. Выбор оптимальной концентрации антигенов проводили, исследуя взаимодействия их различных разведений с полистироловым носителем, с последующей регистрацией результатов ИФА с панелью сывороток больных ЛБ (положительный контроль Р) ( $n=10$ ). В качестве отрицательного контроля (N) использовали панель сывороток здоровых доноров ( $n=10$ ). За оптимальную концентрацию для каждого антигена принимали такую, при которой наблюдалось наибольшее различие в показателях оптической плотности положительного и отрицательного контроля, что соответствовало наибольшему значению их отношения (P/N). Параметр Р определяли как среднее арифметическое для положительных сывороток, а значение N как среднее арифметическое для отрицательных сывороток. Исследуемые белки использовали в концентрации от 1 — 4 мкг/мл, достаточной для эффективной сорбции на полистироле. Для определения специфического комплекса антиген-антитело использовали пероксидазные конъюгаты на основе мышиных моноклональных антител против IgM и IgG человека. Рабочие разведения этих реагентов составили: для анти-IgM 1:3000, для анти-IgG 1:4000.

Для подсчета критической оптической плотности ( $\text{ОП}_{\text{крит}}$ ) использовали 30 отрицательных образцов сывороток здоровых доноров.  $\text{ОП}_{\text{крит}}$  устанавливали статистически как среднее значение ОП для группы здоровых доноров и 2 стандартных отклонений, что соответствовало верхней границе 95% доверительного интервала для возможных значений показателя. Исходя из критических величин ОП с каждым из антигенов проводился анализ результатов тестирования исследуемых сывороток. Образцы считали положительными, если результат превышал пороговое значение  $\text{ОП}_{\text{крит}}$  в двух из трех независимых экспериментов. Для проверки точности экстраполирования результатов ИФА все образцы сывороток были протестированы с каждым из 3 антигенов одновременно.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы Excel для Windows XP. Определение величин среднеквадратической ошибки и другие определения достоверности результатов измерения проводили по критерию Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В наших работах было детально описано получение клонов *E. coli*, продуцирующих рекомбинантные антигены  $\text{OspC}_{\text{gar}}$  и  $\text{OspC}_{\text{afz}}$  [5, 6], а также химерный полипептид  $\text{OspC}_{\text{gar}+\text{afz}}$  [1].

Антигенные свойства и специфичность  $OspC_{gar+afz}$ ,  $OspC_{gar}$  и  $OspC_{afz}$  оценивали методом ИФА по их способности взаимодействовать с антителами сывороток крови больных ЛБ, здоровых доноров, больных сифилисом и ревматоидным артритом. Результаты ИФА образцов сывороток больных ЛБ по выявлению специфических IgM и IgG к  $OspC_{gar+afz}$ ,  $OspC_{gar}$  и  $OspC_{afz}$ , приведены в табл. 1.

При тестировании сывороток больных ЛБ на наличие специфических IgM и IgG к антигенам  $OspC_{gar+afz}$ ,  $OspC_{gar}$  и  $OspC_{afz}$  положительные результаты получены с одним или несколькими антигенами. По результатам исследований в IgM ИФА и IgG ИФА сывороток больных ЛБ наивысшую антигенную активность определяли с  $OspC_{gar+afz}$  антигеном (60,4 и 66,6%, соответственно). Показано, что антигенная активность  $OspC_{gar}$  при выявлении специфических IgM и IgG была несколько выше, чем у  $OspC_{afz}$  антигена. Специфические IgM к  $OspC_{gar}$  антигену выявлены в 25 (52,1%) исследованных сыворотках и в 20 (41,7%) сыворотках к  $OspC_{afz}$  антигену. Результаты использования в ИФА рекомбинантного химерного полипептида  $OspC_{gar+afz}$  в качестве антигена позволили определить максимальное количество положительных сывороток больных ЛБ, в том числе, в сыворотках больных ЛБ, содержащих антитела к  $OspC_{gar}$  и  $OspC_{afz}$  антигенам на подпороговом значении ОП (в силу суммирования оптической плотности).

Специфичность  $OspC_{gar+afz}$ ,  $OspC_{gar}$  и  $OspC_{afz}$  оценивали по результатам исследования контрольных отрицательных сывороток (здоровых доноров, больных сифилисом и ревматоидным артритом) в IgM ИФА и IgG ИФА (табл. 1). Сыворотки здоровых доноров (n=30) и больных сифилисом (n=20) были отрицательными со всеми антигенами. С антигенами  $OspC_{gar+afz}$ ,  $OspC_{gar}$  и  $OspC_{afz}$  сыворотки больных ревматоидным артритом реагировали крайне редко.

По результатам исследования методом ИФА сывороток больных ЛБ и здоровых доноров на наличие специфических IgM и IgG к  $OspC_{gar+afz}$ ,  $OspC_{gar}$  и  $OspC_{afz}$  антигенам была создана экспериментальная панель положительных (n=12) и отрицательных сывороток (n=12). Экспериментальная панель положительных сывороток состояла из образцов сывороток больных ЛБ, содержащих специфические IgM и IgG к исследуемым белкам. Экспериментальная панель отрицательных сывороток составлена из образцов сывороток доноров, не содержащих специфических IgM и IgG к исследуемым белкам. С использованием экспериментальной панели положительных и отрицательных сывороток для каждого антигена определены средние арифметические значения оптической плотности положительных (ОПср+) и отрицательных (ОПср-) сывороток, а также отношение средних арифметических значений оптической плотности положительных и отрицательных сывороток (ОПср+/ОПср-), что позволило оце-

Таблица 1. Данные по выявлению в сыворотках больных ЛБ и контрольных сыворотках специфических IgM и IgG к рекомбинантным белкам *B.burgdorferi* s.l. в ИФА

Антигены	Количество положительных сывороток (%)			
	IgM абс. (%)		IgG абс. (%)	
	ЛБ (n=48)	БРА (n=12)	ЛБ (n=48)	БРА (n=12)
$OspC_{gar}$	25 (52,1)	1 (8,3)	22 (45,8)	1 (8,3)
$OspC_{afz}$	20 (41,7)	1 (8,3)	18 (37,5)	1 (8,3)
$OspC_{gar+afz}$	29 (60,4)	1 (8,3)	32 (66,6)	1 (8,3)

Примечание. n — количество исследуемых образцов сывороток, ЛБ — больные Лайм-боррелиозом с мигрирующей эритемой, БРА — больные ревматоидным артритом.

Таблица 2. Показатели абсолютной чувствительности рекомбинантных белков *B.burgdorferi* s.l. в ИФА по экспериментальной панели сывороток

Оптическая плотность	Рекомбинантный белок		
	$OspC_{afz}$	$OspC_{gar}$	$OspC_{gar+afz}$
При пределении IgM	2,0±0,02	2,26±0,21	2,5±0,04
При пределении IgG	2,1±0,03	2,3±0,21	2,7±0,22

Примечание. Кл — показатель абсолютной чувствительности, равный отношению ОПср+/ОПср-.

днее соотношение положительных и отрицательных сывороток (ОПср+/ОПср-), что позволило оце-

нить степень абсолютной чувствительности антигенов. При сравнительной характеристике антигенов предпочтение отдавалось тем из них, которые давали наибольшее значение отношения ОП положительного и отрицательного контроля (табл. 2). Показано, что антиген  $OspC_{gar+afz}$  имеет самый высокий показатель отношения ОП положительного и отрицательного контроля, по сравнению с  $OspC_{gar}$  и  $OspC_{afz}$ , а значит, и большую абсолютную чувствительность. Таким образом, установлено, что  $OspC_{gar+afz}$ ,  $OspC_{gar}$  и  $OspC_{afz}$  реагируют с поликлональными IgG и IgM сывороток пациентов с заболеваниями, вызванными ЛБ. Проведен сравнительный анализ антигенных свойств рекомбинантного химерного полипептида  $OspC_{gar+afz}$  и рекомбинантных белков  $OspC_{gar}$  и  $OspC_{afz}$  с использованием панели сывороток больных ЛБ. На основании полученных данных можно сделать вывод о возможности использования рекомбинантного химерного полипептида  $OspC_{gar+afz}$  для серодиагностики ЛБ.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно литературным данным,  $OspC$  — один из наиболее важных иммунодоминантных белков, используемых в составе тест-систем для лабораторной диагностики ИКБ [10, 18]. Белок  $OspC$  индуцирует гуморальный иммунный ответ на ранних стадиях инфекции и присутствует во всех без исключения патогенных штаммах *V. burgdorferi* s.l. [11]. Этот белок характеризуется высокой гетерогенностью аминокислотных последовательностей и, как следствие, высокой вариабельностью антигенных свойств. Различия наблюдаются не только между геновидами *V. burgdorferi* s.l. [13], но и внутри геновидов [17]. В наших работах [2, 6] показано, что при использовании в качестве антигенов рекомбинантных белков  $OspC$  геновида *V. garinii* и *V. afzelii* значительно повышается выявляемость заболеваемости ЛБ методом ИФА. Поскольку большинство диагностических иммуноферментных тест-систем основаны на композиции из трех-четырёх рекомбинантных антигенов, то в процессе сорбции антигенов между ними существует конкуренция за участки связывания с поверхностью лунок полистирольных планшетов, что приводит к избытку сорбции одних и снижению доли других и, в свою очередь, негативно отражается на чувствительности и специфичности тест-систем. Одним из путей решения проблем неоднородной сорбции антигенов на твердом носителе является получение генно-инженерными методами химерных полипептидов, содержащих эпитопы 2 и более антигенов боррелий. Поэтому использование в тест-системах химерных антигенов, содержащих эпитопы нескольких гомологичных и гетерологичных видов иммунодоминантных белков, позволит существенно повысить результаты диагностики ЛБ.

Ранее нами были получены фрагменты кодирующих областей генов  $OspC$  изолятов *V. garinii* и *V. afzelii* и клонированы в клетках *E. coli* в составе вектора pETm [5, 6]. Установленные нуклеотидные последовательности фрагментов генов  $OspC_{gar}$  и  $OspC_{afz}$  западно-сибирских изолятов *V. burgdorferi* s.l. и кодируемые этими генами аминокислотные последовательности депонированы в GenBank под номерами  $OspC_{gar}$ -EU979626 и  $OspC_{afz}$ -EU979627, соответственно. При сравнительном структурном анализе гомология аминокислотных последовательностей двух рекомбинантных белков  $OspC$  изолятов *V. garinii* 20047<sup>T</sup> и *V. afzelii* составила 67%. Учитывая, что изоляты *V. garinii* и *V. afzelii* циркулируют на одной территории, выявленная гомология этих белков является достаточно низкой [6]. Низкая гомология аминокислотных последовательностей белков  $OspC$  боррелий является известным фактом, и по оценкам некоторых авторов достигает 60% [16]. Такие отличия в первичных структурах этих антигенов могут обуславливать наличие разных эпитопных детерминант белков и их различную иммунореактивность с сыворотками больных ЛБ.

Следует отметить, что химерный полипептид  $OspC_{gar+afz}$  и рекомбинантные белки  $OspC_{gar}$  и  $OspC_{afz}$ , полученные экспрессией в клетках *E. coli* в составе модифицированного вектора pETm, не содержат протяженных чужеродных амино-

кислотных последовательностей, вследствие чего не дают неспецифических сигналов в иммуноферментных анализах. Это, в свою очередь, обеспечивает повышение специфичности диагностики ЛБ.

Проанализировав взаимодействия сывороток больных ЛБ с каждым рекомбинантным белком OspC мы обнаружили, что OspC<sub>gar</sub> выявляет антитела в сыворотках, которые не выявляются антигеном OspC<sub>afz</sub>, и наоборот. Причем, специфические IgM и IgG в части сывороток выявлялись к OspC<sub>gar</sub> и OspC<sub>afz</sub> антигеном. Эти данные позволяют предположить, что, во-первых, несмотря на гетерогенность первичных структур рекомбинантные белки OspC<sub>gar</sub> и OspC<sub>afz</sub> имеют общие эпитопы среди изолятов двух геновидов боррелий и, во-вторых, возможное инфицирование пациентов одновременно двумя геновидами (*B.afzelii* и *B.garinii*).

По результатам исследований отмечено, что специфические антитела к OspC<sub>gar+afz</sub>, OspC<sub>gar</sub> и OspC<sub>afz</sub> определяются в сыворотках большинства больных ЛБ, что указывает на целесообразность их сочетанного применения в качестве иммуносорбента в иммуноферментных тест-системах. Необходимость такой комбинации объясняется антигенной мозаичностью боррелий, наличием анти-IgM и анти-IgG к OspC<sub>gar</sub> и OspC<sub>afz</sub> при ЛБ и теми соображениями, что препараты, содержащие аналоги отдельных антигенных детерминант, не могут перекрыть весь спектр антител, вырабатываемых при ЛБ.

Следует отметить относительно высокую частоту положительных результатов при исследовании в ИФА сывороток больных ЛБ на наличие специфических IgM и IgG к OspC<sub>gar+afz</sub> антигену. Однако даже использование OspC<sub>gar+afz</sub> антигена не позволяет выявить все положительные сыворотки больных ЛБ. Иными словами, чем больше специфических антигенов будет вовлечено в исследование, тем выше будет надежность и достоверность такого анализа.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о повышенной антигенной активности рекомбинантного химерного полипептида OspC<sub>gar+afz</sub>, содержащего эпитопы западно-сибирских изолятов *B.garinii* и *B.afzelii*, и позволяют рассматривать этот полипептид в качестве перспективного компонента при создании тест-систем для серодиагностики ЛБ на территории Западной Сибири.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Беклемишев А.Б., Рябченко А.В., Караваев В.С. Патент 2514230 РФ. Рекомбинантные химерные полипептиды, несущие эпитопы различных иммунодоминантных белков спирохет комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato*, и способ диагностики иксодового клещевого боррелиоза, опубликован 03.03.2014.
2. Караваев В.С., Рябченко А.В., Беклемишев А.Б. Иммунохимический анализ рекомбинантных белков OspC западносибирских изолятов *Borrelia garinii* и *Borrelia afzelii*. Журн. микробиол. 2010, 1: 20-23.
3. Караваев В.С., Генина Е.С., Рябченко А.В., Беклемишев А.Б. Значимость рекомбинантных белков западносибирских изолятов *Borrelia burgdorferi s.l.* для серодиагностики иксодового клещевого боррелиоза. Клинич. лаб. диагн. 2014, 6: 44-48.
4. Коренберг Э.И., Горелова Н.Б., Ковалевский Ю.В. Основные черты природной очаговости иксодовых клещевых боррелиозов в России. Паразитология. 2002, 36 (3): 177-187.
5. Рябченко А.В., Ивлева И.Н., Беклемишев А.Б. Комплексная оценка зараженности клещей *Ixodes persulcatus*, распространённых в рекреационной зоне новосибирского научного центра, спирохетами *Borrelia burgdorferi s.l.* Журн. инфекц. патол. 2004, 11 (3-4): 107-110.
6. Рябченко А.В., Караваев В.С., Беклемишев А.Б. Сравнительный структурный и иммунохимический анализ рекомбинантных антигенов OspC новосибирских изолятов спирохет *Borrelia garinii* и *B. afzelii*. Бюлл. Сибирского отделения РАМН. 2010, 2: 6-12.
7. Фоменко Н.В., Мельникова О.В., Черноусова Н.Я., Епихина Т.И. Выявление антител к боррелиям комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Бюлл. сибирской медицины. 2008, Прил. 1: 78-84.
8. Aguero-Rosenfeld M.E., Wang G., Schwartz I., Wormser G.P. Diagnosis of lyme borreliosis. Clin. Microbiol. Rev. 2005, 18 (3): 484-509.

9. Baranova E., Solov Ev P., Panfertsev E., Baranova A., Feduykina G., Kolombet L., Morshed M.G., Biketov S. Rational design of antigens to improve the serodiagnosis of tick-borne borreliosis in central regions of Russia. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2014, 807: 9-21.
10. Ivanova L., Christova I., Neves V. et al. Comprehensive seroprofiling of sixteen *B. burgdorferi* OspC: implications for Lyme disease diagnostics design. *Clin. Immunol.* 2009, 132 (3): 393-400.
11. Magnarelli L.A., Ijdo J.W., Padula S.J. et al. Serologic diagnosis of Lyme borreliosis by using enzyme-linked immunosorbent assays with recombinant antigens. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38 (5): 1735-1739.
12. Makhani N., Morris.S.K., Page A.V. et al. A twist on Lyme: the challenge of diagnosing European Lyme neuroborreliosis. *J. Clin. Microbiol.* 2011, 49: 455-457.
13. Mathiesen M.J., Hansen K., Axelsen N. et al. Analysis of the human antibody response to outer surface protein C (OspC) of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, and *B. afzelii*. *Med. Microbiol. Immunol.* 1996, 85 (3): 121-129.
14. Mavin S., Evans R., Milner R.M. et al. Local *Borrelia burgdorferi sensu stricto* and *Borrelia afzelii* strains in a single mixed antigen improves western blot sensitivity. *J. Clin. Pathol.* 2009, 62: 552-554.
15. Stanek G., Reiter M. The expanding Lyme *Borrelia* complex—clinical significance of genomic species. *Clin. Microbiol. Infect.* 2011, 17 (4): 487-493.
16. Wang I.N., Dykhuezen D.E., Qiu W. et al. Genetic diversity of OspC in local population of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. *Genetics.* 1999, 151 (1): 15-30.
17. Wilske B., Jauris-Heipke S., Lobentanzer R. et al. Phenotypic analysis of outer surface protein C (OspC) of *Borrelia burgdorferi sensu lato* by monoclonal antibodies: relationship to genospecies and OspA serotype. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33 (1): 103-109.
18. Wilske B.V., Fingerle U., Schulte-Spechtel U. Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2007, 49 (1): 13-21.

*Поступила 10.08.15*

Контактная информация: Караваев Виталий Семенович, к.м.н.,  
630117, Новосибирск, ул. академика Тимакова, 2, р.т. (383)332-56-58

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*А.А.Печельюк<sup>1</sup>, Ю.Н.Тараканова<sup>1</sup>, А.Д.Дмитриев<sup>1</sup>,  
Ю.С.Массино<sup>1</sup>, О.Л.Сегал<sup>1</sup>, В.Ф.Лавров<sup>1,2</sup>, Д.А.Дмитриев<sup>1</sup>*

## **АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ IgY КУР В СЭНДВИЧ-МЕТОДЕ ТЕСТИРОВАНИЯ НВsAg**

<sup>1</sup>НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, <sup>2</sup>Российская медицинская академия последипломного образования, Москва

*Цель.* Изучение антигенсвязывающей способности поликлональных антител (ПКА) кур по сравнению с моноклональными антителами (МКА) мышей на модели взаимодействия с НВsAg. *Материалы и методы.* Использовали мышинные МКА 18С8 и МКА F3/F4 (IgG), эффективные в иммуноферментном сэндвич-методе определения НВsAg (с минимальной детектируемой дозой 0,017 нг/мл), и аффинно-очищенные анти-НВsAg ПКА кур (IgY), полученные от двух иммунизированных птиц (ПКА №1 и ПКА №2). Способность антител связывать НВsAg оценивали по аналитической чувствительности (угловым коэффициентам кривых связывания) твердофазных иммуноферментных систем с использованием МКА мышей и ПКА кур. *Результаты.* В модельных опытах по связыванию меченого пероксидазой НВsAg ПКА № 2 обеспечивали после адсорбции на полистироловые планшеты статистически значимое 40% увеличение аналитической чувствительности, по сравнению с «эталонными» иммобилизованными МКА 18С8. Однако переход от модельных опытов к применению ПКА № 1 и ПКА № 2 в сэндвич-методе определения НВsAg вместо иммобилизованных МКА 18С8 или детектирующих МКА F3/F4 во всех случаях, напротив, приводил к снижению аналитической чувствительности. *Заключение.* Предположили, что меньшая гибкость ПКА кур может затруднять бивалентное взаимо-