

УДК 579.61:616-094

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА МИКОБАКТЕРИАЛЬНЫХ СИНТЕТИЧЕСКИХ АНТИГЕНОВ ДЛЯ СЕРОДИАГНОСТИКИ ЛЕПРЫ И ТУБЕРКУЛЕЗА

© 2019 г. А. Г. Королёва-Ушакова<sup>1</sup>\*, Е. В. Баранова<sup>1</sup>, С. Г. Игнатов<sup>1</sup>, П. В. Соловьёв<sup>1</sup>, Н. Н. Кондаков<sup>2</sup>, Т. М. Мельникова<sup>2</sup>, П. И. Абронаина<sup>2</sup>, Н. М. Подвальный<sup>2</sup>, Л. О. Кононов<sup>2</sup>, С. Ф. Бикетов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии  
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Роспотребнадзора,  
п. Оболенск, Московской обл., 142279 Россия

<sup>2</sup>Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН,  
Москва, 119991 Россия

\*e-mail: korolyovaushakova@mail.ru

Поступила в редакцию 20.09.2018 г.

После доработки 05.03.2019 г.

Принята к публикации 20.06.2019 г.

Получены синтетические антигены путем конъюгирования с бычьим сывороточным альбумином синтезированных ди- и гексасахаридных детерминант из сложных микобактериальных молекул липоарабиноманнана и фенольного гликолипида. Полученные антигены, различающиеся по структуре и количеству углеводных эпитопов, а также последовательности их конъюгирования, были использованы для серодиагностики микобактериальных инфекций. Проанализированы диагностические параметры чувствительности и специфичности иммунохимического взаимодействия с доступными сыворотками больных лепрой и туберкулезом, а также здоровых доноров. Определены три перспективных синтетических антигена для серодиагностики микобактериозов, которые включали конъюгаты БСА с дисахаридной детерминантой фенольного гликолипида (ФГЛ-1) (DMG–Rha–AEP)–[BSA], дисахаридной детерминантой ФГЛ-1 и гексасахаридной детерминантой липоарабиноманнана (ЛАМ) (DMG–Rha–AEP)–[BSA]–(Ara6–EG6) и диарабинофуранозной детерминантой ЛАМ (Ara2–AEP)–[BSA].

**Ключевые слова:** лепра, *Mycobacterium leprae*, туберкулез, *Mycobacterium tuberculosis*, синтетические микобактериальные антигены, углеводные детерминанты, фенольный гликолипид, липоарабиноманнан, иммуноферментный анализ

**DOI:** 10.1134/S0555109919060096

Патогенные микобактерии, прежде всего возбудители туберкулеза (*Mycobacterium tuberculosis*) и лепры (*Mycobacterium leprae*), вносят значительный вклад в инфекционную патологию человека. Ежегодно возбудитель туберкулеза вызывает около 9 млн новых случаев заболевания и до 2 млн смертей, а в эндемических очагах возбудитель лепры поражает до 200 тыс. людей. Решающее значение в борьбе с микобактериозами имеет ранняя достоверная диагностика заболевания, способствующая успешному лечению и снижению риска передачи инфекции восприимчивым лицам. В последние годы возросший уровень миграции населения из эндемических по туберкулезу и лепре регионов делает актуальной проблему скрининга микобактериозов [http://www.who.int/news-room/factsheets/detail/tuberculosis/]. Бактериоскопия мазков, посев мокроты и рентгеноскопия остаются главными

методами для массовой диагностики активного туберкулеза, а для выявления его латентной формы уже более 100 лет используется низкоспецифичная и трудно интерпретируемая туберкулиновая проба (реакция Манту) [1]. Для замены или дополнения кожного теста разработан метод IGRA (interferon- $\gamma$  release assays), выявляющий *in vitro* по высвобождению гамма-интерферона сенсibilизацию моноцитов крови к очищенным антигенам *M. tuberculosis*. В случае латентного туберкулеза IGRA обладает высокой диагностической специфичностью и чувствительностью, ВОЗ рекомендованы 2 коммерческие тест-системы (QuantiFERON-TB© и T-SPOT.TB©) на его основе [2]. Несмотря на попытки расширить диагностические возможности этого метода за счет добавления новых антигенов, пока он может использоваться только для выявления латентного, но не активного туберкулеза.

В тоже время использование IGRA-тестов затруднено для скрининговых исследований, поскольку они имеют высокую стоимость, требуют специального оборудования и подготовленного персонала. В последние годы были предложены более простые в применении иммунохроматографические тесты, определяющие в крови индуцированные антигенами хемокины (CCL4 и IP10), которые могут служить маркерами, дифференцирующими латентную и активную формы туберкулеза. К классическим лабораторным методам диагностики лепры относятся бактериоскопическое исследование скарификатов кожи (которое является основным для дифференциации на MB (Multibacillary) и PB (Paucibacillary) формы заболевания), функциональные пробы в очагах кожных поражений, определяющие нарушение иннервации кожи и/или мышц, и лепроминовая проба (проба Митсуды), выявляющая, подобно туберкулиновой, гиперчувствительность замедленного типа. Так же, как и при диагностике туберкулеза, предпринимаются попытки по созданию *in vitro* тестов, определяющих индуцируемые лепрозными антигенами хемокины и цитокины (CCL4, IP10 и IL10) [3]. Для диагностики микобактериозов все шире применяют методы амплификации ДНК, включая высокочувствительную и специфичную ПЦР. Однако отсутствие коммерческих тест-систем и необходимость использования дорогостоящих оборудования и материалов, а также высококвалифицированного персонала и специальных помещений, затрудняет их применение при массовых обследованиях [4, 5].

В последнее десятилетие в развивающихся странах широко применяется серодиагностика. Так, только в Индии методами ИФА и иммунохроматографии проводится за год около 1.5 млн анализов для обнаружения специфических антител к микобактериям туберкулеза [6]. К основным преимуществам серодиагностики относят возможность выявления активного заболевания вне зависимости от локализации инфекции, а также доступность его лечения для населения стран с низким уровнем медицины и контроля эффективности этого лечения [7]. История серодиагностики туберкулеза берет начало с 1898 года, когда был применен метод гемагглютинации, сопровождавшийся множеством неспецифических реакций из-за сложного состава антигена. Первыми для серологии туберкулеза в качестве очищенных антигенов были использованы белки, преобладающие в антигенном спектре туберкулина (Ag85B, 38 кДа, 19 кДа, 14 кДа), а также гликолипид, липоарабиноманнан (ЛАМ). Из этих белков-антигенов патогенных микобактерий наиболее изучен комплекс Ag85, состоящий из белков Ag85A, Ag85B, Ag85C и Ag85D с молекулярными массами от 30 до 32 кДа из *M. tuberculosis* и до 35 кДа из *M. leprae*. Они составляют до 30% всех

секретируемых ими белков и обладают миколитрансферазной активностью, необходимой для биогенеза димиколат трегалозы (корд-фактора), являющейся доминантной структурой, ответственной за поддержание целостности клеточной стенки микобактерий и выживаемости патогена [8]. Антигены Ag85A, Ag85B и Ag85C обладали недостаточной серодиагностической эффективностью [9], однако тест на туберкулез с использованием иммунодоминантного пептида A25, присутствующего в Ag85B, позволил достичь 97% специфичности [10]. Помимо Ag85 перспективными серодиагностическими антигенами считаются белки 38 (Rv0934) [11, 12] и 16 кДа (Rv2031c), а также MТВ48 (Rv3881c) из *M. tuberculosis* [13–21].

В начале 80-х годов прошлого века серодиагностика лепры впервые была применена в скрининговых исследованиях для выявления доклинических ее форм среди контактных лиц и жителей эндемичных по лепре регионов. Был использован фенольный гликолипид 1 (ФГЛ-1), который до настоящего времени является основным диагностическим видоспецифичным антигеном возбудителя. Помимо ФГЛ для выявления специфических антилепрозных иммуноглобулинов можно использовать белковые антигены возбудителя. Иммунопротеомный анализ с помощью двумерного электрофореза, иммуноблотинга и масс-спектрометрии 39 цитозольных и мембранных белков позволил заключить, что MMP-1 является оптимальной белковой мишенью при LL и PB формах лепры [22, 23].

В конце прошлого века серодиагностика лепры и туберкулеза получила новый импульс благодаря достижениям молекулярной биологии. Исследования на основе секвенирования геномов и применение протеомного анализа позволили идентифицировать и получить микобактериальные белки и пептиды, обладающие диагностическим и вакцинным потенциалом. Изучено значительное количество рекомбинантных белковых антигенов *M. tuberculosis* и *M. leprae* [16, 19–25]. Особенностью гуморального ответа на белковые антигены при туберкулезе и лепре является его относительно невысокий уровень и направленность против многих антигенов [26, 27], а также выраженные индивидуальная и географическая варибельность. Был сделан вывод, что в случае диагностики туберкулеза серодиагностический тест, основанный на одном антигене, не может быть одинаково чувствительным для всех регионов, эндемичных по туберкулезу [28, 29]. Подобная ситуация наблюдается и в случае лепры, поскольку было показано, что эпитопы, наиболее часто распознаваемые Т-клетками или иммуноглобулинами больных лепроматозной формой лепры, локализованы на нескольких рекомбинантных белках *M. leprae* [30–32]. В связи с этим были предприняты попытки по созданию мультиантигенных/мультиэпитопных тестов, как в случае лепры, так и туберкулеза, путем смешивания

антигенов или объединения эпитопов различных антигенов генетическими (слияние) или химическими (сшивание) методами.

Наиболее высокую чувствительность среди многих испытанных мультиантигенных/мультиэпитопных систем для туберкулеза показали тесты с антигенными композициями, включающими МТВ12, РРЕ57, белки 16 и 38 кДа и ЛАМ [16, 33–36]. Объединение эпитопов в таких генетически слитых полипротеинах-полиантигенах, как 38 кДа/ESAT-6, Ag85B/НВНА, ESAT-6/МРТ70/МРТ83, “ТbF6” (МТВ8/38 кДа/CFP-10/МТВ48 + МРТ32), (38 кДа-ESAT6-CFP10) и (Mtb8.4-МРТ64-ТВ16.3-Mtb8), оказалось достаточно эффективным при серодиагностике туберкулеза (так, в ИФА была достигнута чувствительность 75–85% и специфичность около 90%) [37–39].

Для серодиагностики лепры также были созданы рекомбинантные антигены-полипротеины, в частности, так называемый “LID-1 fusion protein”, состоящий из ML2331 и ML0405 лепрозных антигенов [40].

Однако, несмотря на то, что в экспериментах были получены эффективные комбинации рекомбинантных антигенов и мультиэпитопные антигены, внедрение их в практику не было успешным. Так, ни один из более 70 тестов, представленных на рынок для серодиагностики туберкулеза, не был признан экспертами ВОЗ приемлемым для замены или дополнения микроскопических и культуральных методов диагностики. Разработанные в настоящее время тесты для серодиагностики лепры также не соответствовали требованиям ВОЗ (из-за низкой чувствительности в случае латентной и РВ форм они были пригодны лишь для диагностики мультибациллярной формы заболевания) и не были рекомендованы даже для дополнения текущих методов диагностики [[http://www.who.int/neglected\\_diseases/news/WHO-to-publish-first-guidelines-on-leprosy-diagnosis/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/news/WHO-to-publish-first-guidelines-on-leprosy-diagnosis/en/)]. При использовании для серотестов белков-антигенов оказалось, что в случае туберкулеза существенная часть ответа антител была направлена против высоко иммуногенных углеводных и липидных эпитопов. В связи с этим их различные комбинации, даже компенсируя гетерогенность ответа, не могут обеспечить приемлемую серодиагностическую чувствительность [41]. Установлено также, что титры антител к углеводным эпитопам ЛАМ и ФГЛ-1 снижаются при лечении намного медленнее, нежели титры антител к белкам-антигенам. В связи с этим развитие получил подход, основанный на использовании комплексов белковых и углеводных (из ЛАМ и ФГЛ-1) эпитопов. В ряде работ действительно была продемонстрирована эффективность сочетания ЛАМ и белков-антигенов, как путем смешивания, так и введения углеводных эпитопов в белки путем ковалентного связывания. Так, мультиплексный ИФА серодиагностиком на основе конъюгата

Ara6b-БСА продемонстрировал чувствительность 75% и специфичность 89% [42]. Также было показано, что гликозилирование рекомбинантных белков-антигенов *M. tuberculosis* путем введения в них арабинового домена ЛАМ (31-членный D-арабинофуранозный олигосахарид) позволяло повысить чувствительность выявления сывороток от туберкулезных больных на 5–15% [43].

Из лепрозного ФГЛ-1 были выделены природные дисахаридные (“ND natural disaccharide”) и синтезированы моно-, ди- и трисахаридные детерминанты [16–18], которые использовали в качестве серодиагностических антигенов после связывания с бычьим или человеческим альбумином или рекомбинантными белками *M. leprae* [19–21]. Конъюгирование слитного белкового лепрозного антигена “LID-1” (ML2331 и ML0405) с дисахаридной детерминантой из ФГЛ-1 позволило повысить чувствительность обнаружения при выявлении латентной формы заболевания [44–46]. Результаты, полученные при использовании основных антигенов для серодиагностики лепры в формате ИФА, представлены в табл. 1 [18].

Цель работы – создание новых синтетических антигенов, которые смогут повысить эффективность диагностики туберкулеза и лепры при использовании серотестов, выявляющих родо- и видоспецифические антитела к углеводным эпитопам возбудителей.

## МЕТОДИКА

**Синтез конъюгатов.** В работе был синтезирован ряд антигенов микобактерий на основе конъюгатов синтетических углеводных эпитопов ФГЛ-1 и ЛАМ с БСА. Конъюгацию олигосахаридов с белком проводили в две стадии скватратным методом при помощи диэфира квадратной кислоты по стандартной методике. На первой стадии получали моноскватрат дисахарида, а на второй – проводили конъюгацию с БСА. Конъюгаты очищали хроматографией на колонке ToyoPearl TSK HW-40S (“TOSOH”, Япония). Для определения степени пришивки гаптен-эпитопов использовали метод масс-спектрометрии. Масс-спектры MALDI TOF регистрировали на масс-спектрометре “Bruker micrOTOF II” (“Bruker”, Германия). В полученном спектре идентифицировали необходимый молекулярный пик и рассчитывали количество гаптен-эпитопов, приходящегося на одну молекулу белка [47–51].

**Формирование панели тестируемых проб.** В данной работе были использованы 15 сывороток крови больных лепрой (НИИЛ, Астрахань), 25 сывороток больных туберкулезом и 30 сывороток здоровых доноров, вакцинированных БЦЖ.

**Иммуноферментный анализ.** Для сравнительного анализа серологической активности антигенов по выявлению специфических антимикобактери-

**Таблица 1.** Основные антигены, использованные для серодиагностики лепры в формате ELISA

№	Антиген/форма лепры	Чувствительность	Доверительный интервал, $P = 0.95$	Специфичность	Доверительный интервал, $P = 0.95$
1	ФГЛ-1 (PGL-1) (phenolic glycolipid I)				
	Мультибациллярная (МВ)	78%	60–90%	99%	91–99%
	Пауцибациллярная (РВ)	34%	11–67%	97%	89–99%
2	НД-О-БСА (ND-O-BSA) (natural disaccharide octa bovine serum albumin)				
	Мультибациллярная (МВ)	94%	78–98%	99%	97–99%
	Пауцибациллярная (РВ)	56%	27–81%	99%	98–99%
3	ЛИД-1 (LID-1) (lipid droplet protein- 1)				
	Мультибациллярная (МВ)	79%	66–88%	97	91–99%
	Пауцибациллярная (РВ)	20%	7–46%	97	92–99%

альных антител использовали непрямой иммуноферментный анализ [52].

Планшеты для проведения анализа ("Nunc, MaxiSorp", Дания) сенсibilizировали в течение ночи при 4°C раствором каждого из антигенов, содержащем 1.0, 2.5 или 5.0 мкг/мл БСА в 0.01 М карбонат-бикарбонатном буфере, рН 9.6, или в 0.01 М фосфатно-солевом буфере, рН 7.4. Планшет промывали фосфатно-солевым буфером, содержащем твин (ФСБ-Т), затем добавляли раствор инертного белка (5%-ное обезжиренное молоко в ФСБ) и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. После промывки вносили разведенные (1 : 200) сыворотки крови в объеме 0.1 мл/лунка и планшет инкубировали в течение 1 ч при 37°C, после чего проводили его промывку. В отмытый планшет вносили рабочий раствор с различными разведениями антител к иммуноглобулину человека ("Sigma", А8794, США), конъюгированном с пероксидазой хрена (0.1 мл/лунка), и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. После отмытки в лунки планшета добавляли 0.1 мл свежеприготовленной смеси буфера и субстрата, тетраметилбензидина, (в соотношении 1 : 1). Ферментативную реакцию останавливали после развития окраски (5 мин) добавлением в лунки планшета 0.05 мл 1 М серной кислоты и регистрировали оптическую плотность раствора при 450 нм на планшетном фотометре Униплан ("ЗАО Пикон", Россия). Для оптимизации условий анализа для каждого антигена варьировали рН буфера (9.6 и 7.4) и концентрацию антигена (1.0, 2.5 и 5.0 мкг/мл). Анализ проводили с помощью "шахматного титрования" в серии повторов для каждой сыворотки.

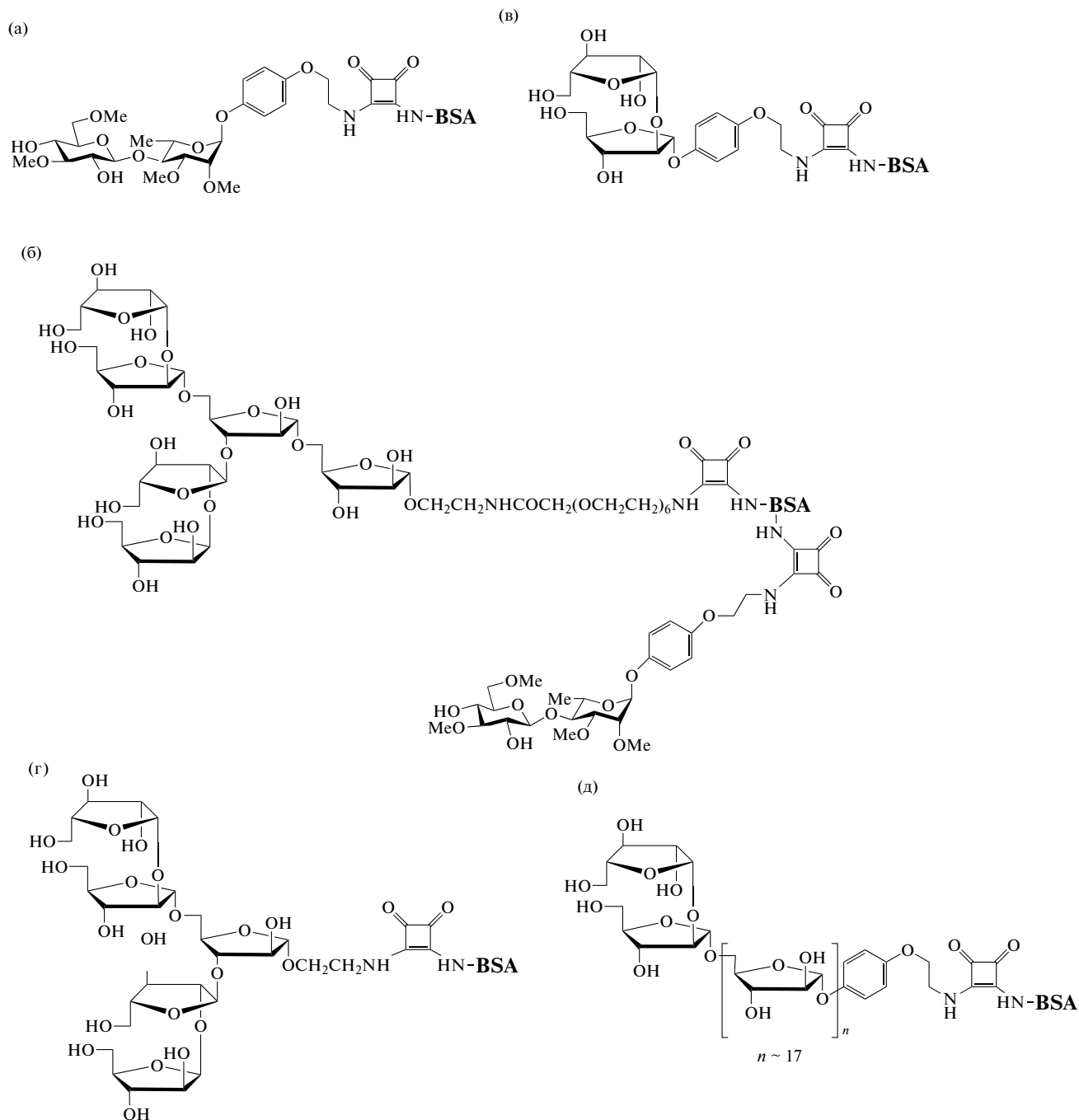
**Обработка и интерпретация полученных данных.** Для обработки и анализа полученных оптических плотностей использовали программу Statistica 10 при  $P = 0.95$ . Статистически достоверные значения ОП использовали для расчета коэффициента позитивности (КС), на основании которого рас-

считывали показатели диагностической чувствительности и специфичности.

Результаты ИФА оценивались по коэффициенту КС, рассчитываемому по формуле:  $КС = ОП \text{ образца} / ОП \text{ критическое}$ , где ОП критическое = ОП К среднее "–" + 0.2. Оценку результатов осуществляли согласно следующим показателям: в случае  $КС < 0.8$  результат считали отрицательным (он указывал на то, что тестируемый образец не содержал антител к возбудителю микобактериозов), а в случае  $0.8 < КС < 1.0$  – сомнительным результатом, указывающим на то, что следовало повторить анализ. При повторном получении промежуточного значения необходимо было отобрать новый образец сыворотки крови через 2–4 нед. и повторить анализ. При этом, если оказывалось  $КС > 1.0$ , то результат считался положительным. В качестве отрицательного контроля (К"–") использовали сыворотку здорового донора, не вакцинированного БЦЖ, (получена из противотуберкулезного диспансера г. Серпухов, Московская область). Диагностическую чувствительность рассчитывали, как отношение числа истинно положительных результатов, деленных на сумму истинно положительных и ложно отрицательных результатов, и выражали в процентах. Диагностическую специфичность рассчитывали, как отношение числа истинно отрицательных результатов, деленных на сумму истинно отрицательных и ложно положительных результатов, и выражали в процентах. Ошибку выборочной доли диагностической чувствительности и специфичности рассчитывали с вероятностью  $P = 0.95$  и критерием достоверности  $t \geq t_{st}$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В работе поставили задачу получить следующие антигены в виде конъюгатов БСА:



**Рис. 1.** Структура конъюгатов № 1712131, № 1712132 и № 1712133 (а), № 1712134 (б), № KF03043 (в), № KF03057 (г) и № PN04012A (д).

– с дисахаридной детерминантой ФГЛ-1 – (DMG–Rha–AEP)–[BSA];

– с дисахаридной детерминантой ФГЛ-1 и гексасахаридной детерминантой ЛАМ – (DMG–Rha–AEP)–[BSA]–(Ara6–EG6);

– с диарабинофуранозной детерминантой ЛАМ – (Ara2–AEP)–[BSA].

Химическим синтезом были получены антигены на основе синтетических углеводных эпитопов

микобактерий, ФГЛ-1 и ЛАМ, конъюгированных с БСА. Эти конъюгаты различались структурой углеводных остатков, степенью пришивки к молекуле белка, а также последовательностью их конъюгирования с БСА (рис. 1). В работе использовали следующие синтезированные конъюгаты:

1-3. № 1712131, № 1712132 и № 1712133, полученные на основе дисахаридного производного ФГЛ-1 (DMG–Rha–AEP)–[BSA]), содержащего

**Таблица 2.** Чувствительность и специфичность ИФА с конъюгатами синтетических углеводных эпитопов микобактерий и БСА

Сыворотки крови	№/шифр конъюгата и его углеводный эпитоп						
	1712131 ФГЛ-1	1712132 ФГЛ-1	1712133 ФГЛ-1	1712134 ФГЛ-1 + + ЛАМ	KF03057 ЛАМ	PN04012A ЛАМ	KF03043 ЛАМ
Здоровые доноры, (специфичность) $n = 30$	33.3% (14.4%–52.2%)	73.3% (56.5%–90.1%)	23.8% (7.0%–40.6%)	75.0% (58.2%–91.85%)	6.3% (–)*	31.3% (14.5%–48.1%)	83.3% (68.6%–98.0%)
Больные лепрой (чувствительность) $n = 15$	42.8% (38.6%–47.0%)	66.6% (41.4%–91.8%)	26.6% (3.5%–49.7%)	75.0% (51.9%–98.1%)	73.0% (49.9%–96.1%)	67.0% (41.8%–92.2%)	73.3% (50.2%–96.4%)
Больные туберкулезом, (чувствительность) $n = 25$	64.0% (43.0%–85.0%)	24.0% (5.1%–42.9%)	76.0% (57.1%–94.9%)	20.0% (17.5%–22.5%)	92.6% (82.1%–100.0%)	74.0% (55.1%–92.9%)	88.5% (75.9%–100.0%)

\* Доверительные границы доли не приведены, так как  $t < t_{st}$ .

различное число (от 19 до 33) дисахаридных остатков на одну молекулу белка (рис. 1);

4. № 1712134, полученного на основе дисахаридного производного ФГЛ-1 и разветвленного гексасахаридного фрагмента ЛАМ (DMG–Rha–AEP)–[BSA]–(Ara6–EG6), содержавшего на одну молекулу белка 19 остатков дисахаридного фрагмента ФГЛ-1 (как в № 1712132) и один остаток разветвленного гексасахаридного фрагмента ЛАМ (рис. 1);

5. № KF03043 – на основе конъюгированного с БСА диарабинофуранозного фрагмента ЛАМ (Ara2–AEP)–[BSA], содержавшего 28 остатков дисахаридного фрагмента ЛАМ на молекулу белка (рис. 1);

6. № KF03057 – на основе конъюгированного с БСА разветвленного пентаарабинофуранозного фрагмента ЛАМ (Ara5–C-2)–[BSA], содержавшего один остаток разветвленного пентасахаридного фрагмента ЛАМ на одну молекулу белка (рис. 1);

7. № PN04012A, полученного на основе конъюгированного с БСА линейного олигосахаридного фрагмента ЛАМ (Ara19–AEP)–[BSA] со средней степенью полимеризации  $DP_n \sim 19$ , содержавшего три фрагмента на молекулу белка (рис. 1) [47–51]. Следующей задачей была оценка потенциала данных антигенов для родо- и видоспецифической серодиагностики микобактериозов.

Оценку диагностической ценности конъюгатов осуществляли методом иммуноферментного анализа сывороток крови больных лепрой и туберкулезом и здоровых доноров. При сенсibilизации планшета для проведения ИФА, оптимальным значением концентрации антигена по белку в 0.05 М карбонат-бикарбонатном буфере, pH 9.6, оказалось 0.5 мкг/мл.

При анализе серологической активности конъюгатов на основе ФГЛ-1 и ЛАМ были определены показатели их чувствительности и специфичности (табл. 2).

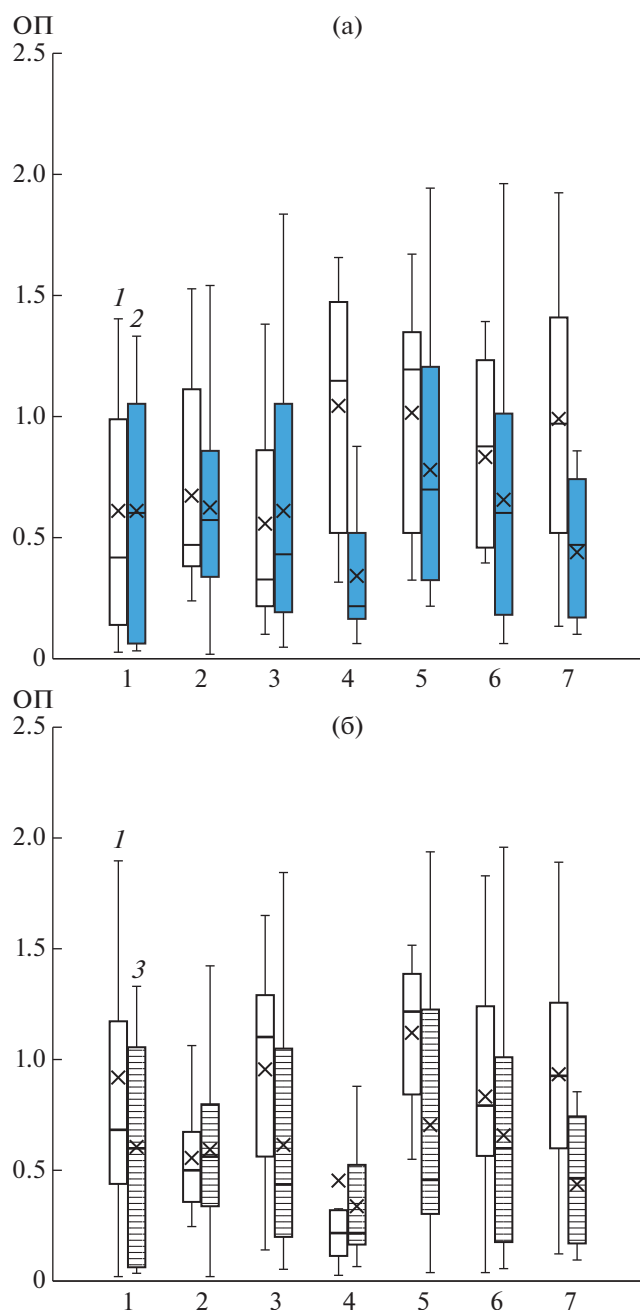
Неспецифического взаимодействия сывороток крови пациентов всех групп только с белковой частью (БСА) всех конъюгатов отмечено не было.

Было установлено, что диагностическая чувствительность реакции в ИФА с использованием синтезированных антигенов зависела от природы синтетических углеводных эпитопов, структуры остатков сахаров и степени их пришивки на молекулу белка, а также последовательности их конъюгирования с БСА.

Как видно из табл. 2, при использовании в качестве антигенной подложки конъюгата № 1712132, в составе которого присутствовало 19 остатков дисахаридного фрагмента ФГЛ-1 на одну молекулу белка, в ИФА конъюгатов на основе синтетических углеводных эпитопов ФГЛ-1 и БСА чувствительность метода по отношению к сывороткам больных лепрой составляла 66.6%, а специфичность – 73.3%.

В то же время, при использовании в качестве антигенной подложки конъюгатов № 1712131 и № 1712133, имевших в составе углеводной детерминанты ФГЛ-1 большее число (33 и 24 соответственно) дисахаридных остатков на одну молекулу белка, обладали наименьшей чувствительностью и специфичностью по отношению к сывороткам больных лепрой. В случае конъюгата № 1712134, содержавшего дисахаридную детерминанту ФГЛ-1 (19 остатков) и гексасахаридную детерминанту ЛАМ (1 остаток сахара), чувствительность составила 75.0% по отношению к сывороткам крови больных лепрой и специфичностью 75.0% к сывороткам крови здоровых доноров. Чувствительность по отношению к сывороткам крови больных туберкулезом составила 20.0%.

При использовании конъюгатов БСА с синтетической углеводной детерминантой ЛАМ было установлено, что для конъюгата № KF03043, содержавшего 28 дисахаридных фрагментов ЛАМ на 1 молекулу белка, чувствительность анализа для



**Рис. 2.** Распределение оптических плотностей в ИФА при взаимодействии с различными конъюгатами (ось абсцисс, конъюгаты 1–7 по тексту выше) сывороток больных лепрой (а, 1 левые столбцы), сывороток больных туберкулезом (б, 1 левые столбцы) и доноров (а и б, 2 правые столбцы).

сывороток от больных туберкулезом составила 88.5%, а специфичность – 83.3%. При этом чувствительность по отношению к сывороткам крови больных лепрой составила 73.3%.

Конъюгаты на основе ЛАМ (№ KF03057 и 04012А, имеющие низкое содержание углеводов на молекулу белка, не обладали достаточ-

ной степенью специфичности с сыворотками здоровых доноров.

Следует отметить, что проведение отбора кандидатных антигенов с использованием ограниченного количества сывороток и групп пациентов, не позволяло провести тестирование, которое в полной мере будет учитывать существующие индивидуальные и географические гетерогенности анти-ответа при туберкулезе и лепре [53–55]. В связи с этим полученные результаты следует рассматривать как ориентировочные и требующие дополнительной проверки.

Таким образом, установлено, что конъюгаты синтетических и природных сахаридов с БСА обеспечивали лучшие показатели серодиагностики у лепрозных больных по сравнению со слитным белковым антигеном (LID-1) или очищенным ФГЛ-1. Несмотря на то, что дисахаридный конъюгат с БСА известен давно [56–59], имелись все основания для улучшения свойств этих антигенов путем оптимизации способа пришивки дисахаридной детерминанты, длины спейсера и степени насыщения ею белка. В случае скрининга на наличие какой-либо микобактериальной инфекции (туберкулез и лепра) оказалось, что для повышения чувствительности серотестов, помимо детерминанты из ФГЛ-1, перспективно использование детерминант из ЛАМ.

В результате работы было проведено сравнение иммунохимической активности семи вариантов синтетических антигенов микобактерий, полученных путем конъюгации с БСА синтетических углеводных эпитопов ФГЛ-1 и ЛАМ. Синтетические антигены-конъюгаты различались структурой углеводных остатков, их количеством на молекулу белка, последовательностью конъюгирования с БСА и взаимодействием с сыворотками крови больных лепрой и туберкулезом, а также здоровых доноров. Сравнительный анализ позволил отобрать три антигена, которые оказались перспективными для дальнейшей разработки средств серодиагностики микобактериозов:

– конъюгат № 1712132 (рис. 2) на основе дисахаридной детерминанты ФГЛ-1 (DMG–Rha-AEP)–[BSA] (дифференциальная серодиагностика лепры);

– конъюгат № 1712134 (рис. 2) на основе дисахаридной детерминанты ФГЛ-1 и гексасахаридной детерминанты ЛАМ (DMG–Rha-AEP)–[BSA]–(Ara6-EG6);

– конъюгат № KF03043 (рис. 2) на основе диарибинофуранозной детерминанты ЛАМ (Ara2-AEP)–[BSA] (серодиагностика микобактериозов – лепра и/или туберкулез).

Для достоверной оценки эффективности различных антигенов в серодиагностике чрезвычайно важным является использование адекватного набора сывороток. Так, при оценке в лаборатор-

ных испытаниях ряда коммерческих серотестов на основе очищенных белковых антигенов использование сывороток из банка ВОЗ (WHO/TDR TB Bank) установлено, что показатели чувствительности (1–60%) и специфичности (53–99%) оказались существенно ниже, чем указано в инструкциях (80–100%). Такие различия эксперты связывают с недостаточным количеством референс-сывороток использованных производителями для контроля тестов и отсутствием независимой валидации [60, 61].

В связи с этим для продолжения работы по конструированию серотестов будет необходимо максимально расширить набор используемых сывороток.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Nayak S.B., Acharjya V.* // Indian. Dermatol. Online J. 2012. V. 3. P. 2–6.  
<http://www.idoj.in/text.asp?2012/3/1/2/93479>
2. *Sester M., Sotgiu G., Lange C., Giehl C., Girardi E., Migliori G.B., Bossink A., Dheda K., Diel R., Dominguez J., Lipman M., Nemeth J., Ravn P., Winkler S., Huitric E., Sandgren A., Manissero D.* // Eur. Respir. J. 2011. V. 37. № 1. P. 100–111.
3. *Corstjens P.L.A.M., Fat T.K., Elisa M., Claudia J., Jolien J., Chegou C., Novel N., Sutherland J.S., Rawleigh M.A., Desta K., Harriet S.F., Ottenhoff H.M., Gerhard W., Geluk A.* // Clin. Biochem. 2016. V. 49. № 1–2. P. 22–31.
4. *Hooij A., Elisa M., Tjon Kon Fat, Richardus R., Susan J.F., Wilson L., Dood C.J., Faber R., Korshed A., Hendrik J., Richardus H., Corstjens P.L.A.M., Geluk A.* // Sci. Rep. 2016. V. 29. № 6. P. 34260–34265.
5. *Silva A.R., Queiroz M.F.A., Ishikawa A.Y.E., Silvestre M.P.S.A., Xavier M.B.* // Bras. Pat. Med. Lab. J. 2017. V. 48. № 2. P. 295–298.
6. *Wen Y., Xing Y., Yuan L.C., Liu J., Zhang Y., Li H.Y.* // J. Trop. Med. Hyg. 2013. V. 88. № 5. P. 918–922.
7. *Lancelot Pinto M., Grenier J., Schumacher S.G., Claudia M., Denkinger K.R., Steingart M.P.* // Med. Princ. Pract. 2012. V. 21. № 1. P. 4–13.
8. *Gennaro M.L.* // Clin. Infect. Dis. 2000. V. 30. № 11. P. 243–246.
9. *Chan E.D., Heifets L., Iseman M.D.* // Tuber. Lung. Dis. 2000. V. 80. № 3. P. 131–140.
10. *Kumar G., Dagur P.K., Joshi B.* // Arch. Immunol. Ther. Exp. 2010. V. 58. № 1. P. 57–65.
11. *Selma W.B., Harizi H., Marzouk M., Ben Kahla I., Ben Lazreg F., Ferjeni A., Harrabi I., Abdelghani A., Ben Said M., Boukadida J.* // Int. Tuber. Lung. Dis. J. 2010. V. 14. № 7. P. 841–846.
12. *Senol G., Erer O.F., Yalcin Y.A., Coskun M., Gunduz A.T., Bicmen C., Ertas M., O'zkan S.A.* // Eur. Respir. J. 2007. V. 29. № 1. P. 143–148.
13. *Kaushik A., Singh U.B., Porwal C., Venugopal S.J., Mohan A., Krishnan A., Goyal V., Banavaliker J.N.* // Indian. J. Med. Res. 2012. V. 135. № 5. P. 771–777.
14. *Kunnath-Velayudhan S., Salamon H., Wang H.Y., Davidow A.L., Molina D.M.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. № 33. P. 14703–14708.
15. *Hunter S.W., Brennan P.J.* // J. Bacteriol. 1981. V. 147. № 3. P. 728–735.
16. *Spenser J., Brennan P.* // Lepr. Rev. 2011. № 82. P. 344–357.
17. *Fujiwara T., Hunter S.W., Cho S.N.* // Infect. Immun. 1984. V. 43. № 1. P. 245–252.
18. *Espinosa O.A., Ferreira S.M.B., Palacio F.G.L., Costa D., Cortela B., Ignotti E.* // Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol. 2018. V. 35. № 11. P. 1–11.
19. *Dinnis J., Deeks J., Kunst H., Gibson A., Gummins E., Waugh N., Drobniewski F., Lalvani A.* // Health Technol. Assess. 2007. V. 11. № 3. P. 1–196.
20. *Nathavitharana R.R.M., Cudahy P.G.T., Schumacher S.G., Steingart K.R., Pai M., Denkinger C.M.* // Eur. Respir. J. 2017. V. 49. № 1. P. 1–30.
21. *Flores L.L., Steingart K.R., Dendukuri N., Schiller I., Minion J., Pai M., Ramsay A., Henry M., Laal S.* // Clin. Vaccine Immunol. 2011. V. 18. № 11. P. 1616–1627.
22. *Moura R.S., Penna G.O., Fujiwara T., Pontes M.A., Cruz R., Goncalves H.deS.* // J. Immunol. Methods. 2014. V. 412. P. 35–41.
23. *Muñoz M., Beltrán-Alzate J.C., Duthie M.C., Serrano-Coll H., Cardona-Castro N.* // Am. J. Trop. Med. Hyg. 2018. V. 98. № 1. P. 274–277.
24. *Hunter S.W., Rivoire B., Mehra V., Bloom B.R., Brennan P.J.* // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. № 24. P. 14065–14068.
25. *Kumar A., Girdhar B.K., Parkash O.* // Int. J. Biol. Med. Res. 2010. V. 1. № 4. P. 242–247.
26. *Tsakamoto Y., Maeda Y., Makino M.* // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2014. V. 80. № 1. P. 62–65.
27. *Tong M., Jacobi C.E., van de Rijke F.M., Kuijper S., van de Werken S., Lowary T.L., Hokke C.H., Appelmelk B.J., Nagelkerke N.J.D., Tanke H.J., van Gijlswijk R.P.M., Veuskens J., Kolk A.H.J., Raap A.K.* // J. Immunol. Methods. 2005. V. 301. № 1. P. 154–163.
28. *Жердев А.В., Мартыанов А.А., Авдиенко В.Г., Бабаян С.С., Гергерт В.Я., Калюкина А.С., Лауринавичут Д.К., Позднякова Н.В., Федоров А.Н., Северин Е.С., Панферцев Е.А., Бикетов С.Ф., Бызова Н.А., Дзантиев Б.Б.* // Физиология и патология иммунной системы. 2006. Т. 9. С. 3–8.
29. *Дятлова В.И., Богун А.Г., Бикетов С.Ф.* // Биотехнология. 2014. № 1. С. 72–78.
30. *Duthie M.S., Orcullo F.M., Abbelana J., Maghanoy A., Balagon M.F.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2016. V. 100. № 7. P. 3267–3275.
31. *Prakash O., Kumar A., Nigam A., Franken K.L., Ottenhoff T.H.* // Scand. J. Immunol. 2006. V. 64. № 4. P. 450–455.
32. *Spencer J.S., Dockrell H.M., Kim H.J.* // J. Immun. 2005. V. 175. № 12. P. 7930–7938.
33. *Lyashchenko K.P., Pollock J.M., Colangeli R., Gennaro M.L.* // Infect. Immun. 1998. V. 66. № 11. P. 5344–5449.
34. *Duthie M., Raychaudhuri S.R., Tutterrow Y.L.* // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2014. V. 7. № 2. P. 233–239.
35. *Gennaro M.L.* // Clinical infectious diseases. 2000. № 30. P. 243–246.
36. *Fujita Y., Doi T., Sato K., Yano I.* // Microbiology. 2005. V. 151. № 6. P. 2065–2074.
37. *Sampaio L.H., Stefani M.M.A., Oliveira R.M., Sousa A.L.M., Ireton G.C., Reed S.G., Duthie M.S.* // Infect. Dis. 2011. V. 11. № 1. P. 1–11.
38. *Zhang G., Zhang L., Hu S.* // Genomics proteomics bioinformatics. 2009. V. 7. № 3. P. 107–115.



39. Raja A., Ranganathan U.D., Bethunaickan R. // *Diag Microbiol Infect Dis*. 2008. V. 60. № 4. P. 361–368.
40. Zhang L., Sun Y., Zhang G., Li G., Li B., Cheng X. // *Afr. J. Microbiol. Res*. 2011. V. 5. № 26. P. 4569–4576.
41. He X.Y., Li J., Hao J., Chen H.B., Zhao Y.Z., Huang X.Y., He K., Xiao L., Ye L.P., Qu Y.M., Ge L.H. // *Clin. Vaccine immunol*. 2011. V. 18. № 4. P. 565–570.
42. Steingart K.R., Ramsay A., Dowdy D.W., Pai M. // *Indian. J. Med. Res*. 2012. V. 135. № 5. P. 695–702.
43. Feng X., Xiu B., Chen K., Yang X., Zhang H., Yue J., Tan Y., Li H., Nicholson R.A., Tam A.W., Zhao P., Zhang L., Liu J., Song X., Wang G., Zhang H. // *J. Infect*. 2013. V. 66. № 4. P. 366–75.
44. Tong M., Jacobi C.E., van de Rijke F.M., Kuijper S., van de Werken S., Lowary T.L., Hokke C.H., Appelmelk B.J., Nagelkerke N.J.D., Tanke H.J., van Gijlswijk R.P.M., Veuskens J., Kolk, A.H.J., Raap A.K. // *J. Immunol. Methods*. 2005. V. 301. № 1–2. P. 154–163.
45. Spencer J.S., Duthie M.S., Geluk A., Balagon M.F., Kim H.J., Wheat W.H., Chatterjee D., Jackson M., Li W., Kurihara J.N., Maghanoy A., Mallari I., Saunderson P., Brennan P.J., Hazel M. // *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2012. V. 107. № 1. P. 79–89.
46. Hotez P., Aksoy S. // *S. Negl. Trop. Dis*. 2017. V. 11. № 4. P. 1–6.
47. Fedina K.G., Abronina P.I., Podvalnyy N.M., Kondakov N.N., Chizhov A.O., Torgov V.I., Kononov L.O. // *Carbohydr. Res*. 2012. T. 357. P. 62–67.
48. Abronina P.I., Fedina K.G., Zinin A.I., Chizhov A.O., Kondakov N.N., Torgov V.I., Kononov L.O. // *Carbohydr. Res*. 2014. T. 396. P. 25–36.
49. Podvalnyy N.M., Abronina P.I., Fedina K.G., Zinin A.I., Chizhov A.O., Kondakov N.N., Torgov V.I., Kononov L.O. // *Russian Chemical Bulletin*. 2015. V. 64. № 5. P. 1149–1162.
50. Podvalnyy N.M., Chizhov A.O., Zinin A.I., Kononov L.O. // *Carbohydr. Res*. 2016. V. 431. P. 25–32.
51. Chernyak A., Karavanov A., Ogawa Y., Kováč P. // *Carbohydr. Res*. 2001. T. 330. № 4. P. 479–86.
52. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантмиев Б.Б. // Москва. Высшая школа, 1991. 288 с.
53. Duthie M.S., Hay M.N., Morales C.Z. // *Clin. Vaccin. Immun.* 2010. V. 17. № 2. P. 298–303.
54. Duthie M.S., Orcullo F.M., Abbelana J., Maghanoy A., Balagon M.F. // *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2016. V. 100. № 7. P. 3267–75.
55. Silva M.B., Portela J.M., Wei L., Jackson M., Juarrero M.G., Hidalgo A.S., Belisle J.T., Bouth R.C., Gobbo A.R., Barreto J.G., Minervino A.H., Cole S.T., Avanzí C., Busso P., Marco A., Frade C., Geluk A., Salgado C.G., Spencer J.S. // *Negl. Trop. Dis*. 2018. V. 12. № 6. P. 1–19.
56. Duthie M.S., Goto W.G., Ireton C., Reece S.T., Sampaio L.H., Grassi A.B., Sousa A.L., Celina M.T., Martelli M.A., Reed S.G. // *Clin. Vaccin. Immunol*. 2008. V. 15. № 11. P. 1659–65.
57. Briken V., Porcelli S.A., Besra G.S., Kremer L. // *Mol. Microbiol*. 2004. V. 53. № 2. P. 391–403.
58. Spencer J.S., Kim H.J., Wheat W.H. // *Clin. Vaccine Immunol*. 2011. V. 18. № 2. P. 260–267.
59. Fujiwara T., Hunter S.W., Cho S.N. // *Infect. Immun*. 1984. V. 43. № 1. P. 245–252.
60. Wells V.C., Morris A.J. // *J. Clin. Microbiol*. 2000. V. 38. № 6. P. 2227–31.
61. Singh S., Katcoh V.M. // *Indian. J. Med. Res*. 2011. V. 134. № 5. P. 583–87.

## Comparative Characteristic of the Diagnostic Potential of Mycobacterial Synthesized Antigens for the Serodiagnosis of Leprosy and Tuberculosis

A. G. Korolyova-Ushakova<sup>a,\*</sup>, E. V. Baranova<sup>a</sup>, S. G. Ignatov<sup>a</sup>, P. V. Soloviev<sup>a</sup>, N. N. Kondakov<sup>b</sup>, T. M. Mel'nikova<sup>b</sup>, P. I. Abronina<sup>b</sup>, N. M. Podval'nyi<sup>b</sup>, L. O. Kononov<sup>b</sup>, and S. F. Biketov<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Federal Budget Institution of Science State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology Federal Service of Surveillance in the Field of Consumer Right Protection & Human Welfare (FBIS SRCAM&B) Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russia

<sup>b</sup>N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia

\*e-mail: korolyovaushakova@gmail.com

Received September 20, 2018; revised March 05, 2019; accepted June 20, 2019

Seven of artificial mycobacterial antigens by conjugation of synthetic carbohydrate epitopes of *M. leprae* phenolic glycolipid (PGL-1) and *M. tuberculosis* lipoarabinomannan (LAM) with bovine serum albumin (BSA) were synthesized. Each of antigens has different number of carbohydrate epitopes with different structure and sugar residues input sequence. According of serum reactivity only three synthesized antigens can be useful for serodiagnosis of mycobacteriosis: 1. Based on disaccharide derivative PGL-1: (DMG–Rha–AEP)–[BSA]; 2. Based on disaccharide fragment of PGL-1 and hexasaccharide fragment of LAM: (DMG–Rha–AEP)–[BSA]–(Ara6–EG6); 3. Based on the LAM di-arabinofuranose fragment: (Ara2–AEP) – [BSA].

**Keywords:** leprosy, tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, synthetic mycobacterial antigens, phenolic glycolipid, lipoarabinomannan, ELISA