

# ПОИСК ОПТИМАЛЬНОЙ КОМБИНАЦИИ АНТИГЕНОВ ДЛЯ СЕРОДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА

Е.В. Васильева<sup>1</sup>, В.Н. Вербов<sup>1</sup>, А.Б. Беклемишев<sup>2</sup>, А.Л. Мамаев<sup>2</sup>, А.О. Цырульников<sup>2</sup>, Т.А. Степаненко<sup>3</sup>, В.Б. Ивановский<sup>4</sup>, С.В. Лапин<sup>5</sup>, Арег А. Тотолян<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>ФГБУ НИИ биохимии СО РАМН, г. Новосибирск, Россия

<sup>3</sup>СПб ГБУЗ Городская многопрофильная больница № 2, Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup>СПб ГБУЗ Городской Противотуберкулезный диспансер, Санкт-Петербург, Россия

<sup>5</sup>Санкт-Петербургский Государственный медицинский университет имени академика Павлова, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Методами генной инженерии получено четыре химерных рекомбинантных антигена: CBD-CFP10, CBD-ESAT6, ESAT6-CFP10 и CBD-P38, содержащих аминокислотные последовательности полноразмерных белков ESAT6 и CFP10 и зрелого белка P38 *M. tuberculosis*, состыкованные с аминокислотной последовательностью целлюлозосвязывающего домена эндоглюконазы А (CBD) из *Cellulomonas fimi*. Рекомбинантные белки были очищены методом аффинной хроматографии на колонке с Ni-NTA-сефарозе 6B-CL и, наряду с PPDN-3, были использованы для определения их антигенной активности в непрямом варианте ИФА при серодиагностике ТБ. В работе исследовались сыворотки, полученные от больных туберкулезом легких (n = 321), от лиц, имеющих профессиональный контакт с больными ТБ (n = 42), от здоровых доноров (n = 366) и от больных заболеваниями легких нетуберкулезной этиологии (n = 68). Было выявлено наличие достоверной положительной корреляции между уровнями антител против всех исследованных антигенов, сравниваемых попарно. Показано, что антигены существенно отличаются по своим антигенным и иммунобиологическим свойствам, но дополняют друг друга в составе антигенных диагностических композиций и могут найти применение в тест-системах для серодиагностики ТБ. Использование данных антигенов позволит выявлять лиц, инфицированных ТБ, а также выявлять больных с активным ТБ.

**Ключевые слова:** *M. tuberculosis*, *E. coli*, синтетические гены, клонирование, экспрессия, P38, ESAT6, CFP10, антигенные свойства, сыворотки.

## Введение

В настоящее время отмечается рост заболеваемости туберкулезом (ТБ) и смертности от него, особенно в странах Восточной Европы, в том числе в Российской Федерации. По данным Росстата в 2010 г. в РФ заболеваемость ТБ

составила 76,9 на 100 тыс. населения [5]. Одной из важнейших задач борьбы с туберкулезной инфекцией является создание быстрых и высокоэффективных методов для своевременной диагностики этого заболевания. Из современных лабораторных методов наиболее актуальными являются серологические методы [4]

### Авторы:

**Васильева Е.В.**, младший научный сотрудник лаборатории биопрепаратов ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург;

**Вербов В.Н.**, к.х.н., зав. лабораторией биопрепаратов ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург;

**Беклемишев А.Б.**, д.б.н., зав. лабораторией генной инженерии ФГБУ НИИ биохимии СО РАМН г. Новосибирск;

**Мамаев А.Л.**, младший научный сотрудник ФГБУ НИИ биохимии СО РАМН, г. Новосибирск;

**Цырульников А.О.**, младший научный сотрудник ФГБУ НИИ биохимии СО РАМН, г. Новосибирск;

**Степаненко Т.А.**, зав. отделением пульмонологии № 2 СПб ГБУЗ Городская многопрофильная больница № 2, Санкт-Петербург;

**Ивановский В.Б.**, к.м.н., заместитель главного врача по лечебной работе СПб ГБУЗ Городской противотуберкулезный диспансер, Санкт-Петербург;

**Лапин С.В.**, к.м.н., зав. лабораторией НМЦ по молекулярной медицине СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург;

**Тотолян Арег А.**, член-корреспондент РАМН, д.м.н., профессор, заместитель директора по научной работе ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург.

### Адрес для переписки:

Васильева Елена Викторовна  
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14, ФБУН НИИЭМ имени Пастера.  
Тел.: (812) 232-80-35 (служебн.). Факс: (812) 325-27-10.  
E-mail: ev\_vasilyeva@pasteurorg.ru

поступила в редакцию 26.04.2013  
отправлена на доработку 27.04.2013  
принята к печати 30.04.2013

© Васильева Е.В. и соавт., 2013

(ИФА, иммунохроматография), так как они наиболее экспрессны, низкзатратны и могут быть автоматизированы. Тем не менее на сегодняшний день серологические методы диагностики ТБ не нашли широкого применения в медицинской практике в связи со значительным количеством ложноположительных и ложноотрицательных результатов тестирования [6, 14, 16, 18, 21]. Недостаточная специфичность связана, в том числе, с кросс-реактивностью белковых антигенов *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) с гомологичными белками других родственных микроорганизмов. Недостаточная чувствительность объясняется тем, что микобактерия способна синтезировать несколько сотен антигенов и экспрессия их генов на разных стадиях инфекции, при легочной и других формах ТБ, а также на фоне иммунодефицитных состояний (например, ВИЧ-инфекции), неодинакова.

В последние годы, после полной расшифровки генома *M. tuberculosis* [7], были достигнуты значительные успехи в идентификации антигенов *M. tuberculosis*, которые могут быть использованы для создания высокочувствительных и специфичных тестов оценки противотуберкулезного гуморального и клеточного ответа [8, 9, 12, 21, 24, 25]. Наиболее изученными из них являются белки 38 kDa, 16 kDa, katG, MPT63, MPT64, Esat6, Cfp10, MTC28, Mtb39, Mtb81 и PPE68, которые включены в большое количество исследований, направленных на создание диагностических тест-систем. Неоднократно было показано, что тест-системы, в которых используется комбинация различных антигенов *M. tuberculosis*, обладают более высокой чувствительностью и специфичностью по сравнению с тест-системами, сконструированными на основе только одного антигена [1, 4, 11, 13, 17, 19, 20, 22, 23].

Настоящая работа посвящена получению рекомбинантных химерных белков *M. tuberculosis* и изучению возможности их применения наряду с природным антигеном PPDN-3, как в индивидуальном виде, так и в составе мультиантигенных композиций в непрямом варианте ИФА при серодиагностике ТБ для решения различных клинических задач.

## Материалы и методы

**Реактивы**, используемые для проведения электрофореза ДНК и белков в агарозном и полиакриламидном гелях производства фирмы «Sigma-Aldrich» (США). Дрожжевой экстракт, бакто-триптон, агар фирмы «Difco» (Великобритания). Ni-NTA-сефароза 6B-CL, набор для выделения ДНК из агарозного геля фирмы «Qiagen» (США). Фенол, лизоцим, хлороформ, этанол, кислоты, щелочи, соли квалификации «ХЧ» или «ОСЧ» производства «Рехим» (Россия).

**Ферменты**: ДНК-полимераза Phusion («Finnzymes», Финляндия), ДНК-лигаза бактериофага T4, эндонуклеазы рестрикции фирмы «Сибэнзим» (Россия).

**Штаммы *Escherichia coli***: BL21 (DE3) и Rosetta 2 (DE3).

**Плазмидные векторные ДНК**: а) pET36b<sup>(+)</sup> («Novagen», США); б) pETm-cbd — модифицированный нами вектор pET36b<sup>(+)</sup>, в котором за нуклеотидной последовательностью целлюлозосвязывающего домена эндоглюконазы А (CBD<sub>СенА</sub>) из *Cellulomonas fimi* следует встроенная последовательность полилинкера, включающего сайты узнавания эндонуклеазы рестрикции в указанной последовательности: AgeI, EcoRI, KpnI, BssHII, BstEII, HindIII, XhoI; в) pJExpress401-esat6-cfp10 («DNA2.0», США).

**Коммерческие антигены *M. tuberculosis***: антиген PPDN-3, который представляет собой ультрафильтрат культур возбудителя туберкулеза штаммов DTST и Valee и используется в тест-системе «ИФА-анти-ТУБ», выпускаемой Отделом Новых Технологий ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (Санкт-Петербург);

**Биологический материал**. Образцы сывороток крови были получены от больных туберкулезом (БЛ) легких (n = 321), проходивших стационарный этап лечения в СПб ГУЗ ПТБ № 3 в 2011–2012 гг. в возрасте от 18 до 76 лет (54% мужчин, 46% женщин), средний возраст составил 38 лет (30 для мужчин и 48 для женщин). У 71% больных имел место инфильтративный ТБ легких, у 14% — фиброзно-кавернозный ТБ. Оставшиеся 15% составили больные казеозной пневмонией, очаговым ТБ, диссеминированным ТБ и туберкулезом. У 86% больных диагноз ТБ был подтвержден микроскопией мокроты или культуральным методом (посев мокроты). 52% составили больные с впервые выявленным ТБ, оставшиеся 48% — с хроническим ТБ процессом. Сыворотки крови были получены также и от больных с заболеваниями легких нетуберкулезной этиологии (НЗЛ): больные саркоидозом (n = 40) и пневмонией (n = 28), находившиеся на лечении в СПб ГУЗ ГМПБ № 2. Для подтверждения диагноза «саркоидоз» 30% пациентов проводилась чрезбронхиальная биопсия, с гистологическим исследованием препарата, окраски по Цилю–Нильсену, а также ПЦР смывов из трахеобронхиального дерева на МБТ. У 70% активность ангиотензинпревращающего фермента была выше, чем верхняя граница референтного интервала 70 ед/мл.

Были исследованы также сыворотки крови здоровых сотрудников противотуберкулезных учреждений (n = 42), имеющих профессиональный контакт с больными ТБ не менее 1 года, без

клинических и радиографических признаков активного ТБ (контактные лица, КЛ) в возрасте от 25 до 73 лет (18% мужчин, 82% женщин), средний возраст составил 48 лет (37,5 — для мужчин и 57 — для женщин). Группу сравнения составили 366 здоровых доноров (ЗЛ). Все лица, включенные в исследование ( $n = 797$ ), не были инфицированы ВИЧ.

**Оптимизация первичной структуры химерного гена *esat6-cfp10*.** Нуклеотидную последовательность искусственного химерного гена, кодирующего полипептид, включающий полноразмерные аминокислотные последовательности белков *Esat6* и *Cfp10* *Mtb*, проектировали с использованием компьютерной программы Gene-Designer 2.0 фирмы DNA2.0 (США), обеспечивающей оптимизацию кодонов в гене для эффективной его экспрессии в клетках *E. coli*. Кроме того, с применением разработанной нами программы проводили поиск пар кодонов, которые по литературным данным [10] затрудняют или даже останавливают трансляцию мРНК в *E. coli*, и заменяли их на синонимические кодоны.

**Сборка и клонирование химерных генов *cbd-cfp10* и *cbd-esat6*.** Гены белков *Esat6* и *Cfp10* в составе вектора pJExpress401/*esat6-cfp10* амплифицировали методом ПЦР с использованием соответствующих пар праймеров. Прямой и обратный праймеры, предназначенные для амплификации генов *esat6* и *cfp10*, содержали на 5'-концах дополнительные последовательности, включающие сайты рестрикции AgeI и EcoRI (для гена *esat6*) и EcoRI и XhoI (для гена *cfp10*) соответственно. Полученные ампликоны после гидролиза эндонуклеазами рестрикции встраивали по этим сайтам в полилинкер плазмиды pETm/*cbd*, гидролизованной соответствующими рестриктазами, с использованием ДНК-лигазы фага T4. Продукты гидролиза ДНК эндонуклеазами рестрикции и ампликоны генов анализировали с помощью электрофореза в 5–12% ПААГ или в 0,8–2% агарозном геле [3]. Последующие процедуры трансформации электрокомпетентных клеток *E. coli* BL21 (DE3) лигазными смесями, отбора рекомбинантных клонов на селективной среде и их анализа на наличие целевых ДНК-вставок проводили, как было описано нами ранее для получения штамма *E. coli* — продуцента химерного белка СВД-Р38 [2].

**Анализ экспрессии генов рекомбинантных химерных белков.** Об экспрессии клонированных генов судили по данным электрофореза белков из лизатов клеток рекомбинантных клонов *E. coli*, проводившегося в пластинах полиакриламидного геля в денатурирующих условиях по методу Лэммли. Определение внутриклеточной локализации рекомбинантных химерных белков осуществляли согласно методике [15].

**Выделение и очистка рекомбинантных белков.** Клетки отобранных рекомбинантных клонов *E. coli*, продуцирующих химерные белки, выращивали в колбах вместимостью 2 л, содержащих 400 мл среды LB (0,5% дрожжевого экстракта, 1% триптона и 0,5% NaCl) в присутствии 30 мкг/мл канамицина на орбитальном шейкере при 37°C 120 об/мин до оптической плотности  $OD_{600} = 1,0$ . Затем в культуру вносили ИПТГ до конечной концентрации 0,5–1 mM и продолжали выращивание клеток в течение ночи при 30°C. Клетки осаждали центрифугированием при 5000g, 10 мин. Осадок клеток суспендировали в буфере, содержащем 50 mM Na-фосфат pH 8,0, 300 mM NaCl из расчета 3–5 мл буфера на 1 г веса клеток. В суспензию вносили лизоцим до конечной концентрации 1–2 мг/мл, инкубировали во льду 30 мин и затем «озвучивали» суспензию в ледяной ванне 6–8 раз по 20–30 с на максимальной мощности (200–300 Вт) УЗ-дезинтегратора. «Озвученную» суспензию освобождали от клеточного дебриса центрифугированием при 5000g, 10 мин, а супернатант центрифугировали при +4°C, 30 мин, при 40 000g. В надосадочной жидкости должны содержаться рекомбинантные антигены в растворимом состоянии, а в осадке тельца включения — рекомбинантные белки в нерастворимой форме. В зависимости от локализации рекомбинантного белка в клетках *E. coli* (в растворимом состоянии в цитоплазме, или в нерастворимом виде в тельцах включения) проводили аффинную хроматографию на колонке с Ni<sup>2+</sup>-NTA-сефарозе 6B-CL соответственно в нативных, либо в денатурирующих условиях [2].

**Получение лизата клеток *E. coli* для истощения исследуемых сывороток от антител к антигенам *E. coli*.** Из выращенных клеток штаммов *E. coli* BL-21(DE3) или Rosetta 2(DE3), не содержащих рекомбинантных плазмид, получали «озвученные» суспензии как описано выше. После центрифугирования суспензий при +4°C, 30 мин, при 40 000g, отбирали супернатант, расфасовывали его аликвотами по 1–2 мл и хранили при –20...–70°C. Полученные супернатанты использовали в иммуноферментном анализе для истощения исследуемых сывороток от антител к антигенам *E. coli*.

**Определение концентрации белка.** Концентрацию рекомбинантного белка определяли по Лорури либо флуоресцентным методом при помощи прибора и набора Qubit® (Invitrogen, USA) согласно инструкции фирмы.

**Твердофазный иммуноферментный анализ.** Непрямой вариант ИФА для обнаружения IgG антител к полученным антигенам (ПТА) проводили по методике с использованием реагентов из набора «ИФА-анти-ТУБ», производства ФБУН НИИ имени Пастера (Санкт-Петербург).



С целью определения оптимальной концентрации исследуемые антигены наносили в лунки планшет (Nunc Polysorp, Дания) в концентрациях от 10 до 0,05 мкг/лунку и проводили ИФА. Результаты определения показали, что 1 мкг антигенов на лунку является оптимальной дозой, при которой разница между оптической плотностью положительного и отрицательного пула является максимальной.

**Статистическая обработка данных.** Для статистической обработки полученных данных использовали пакеты программ MS Excel, SPSS (версия 13.0), Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.). Полученные данные представлены в виде медианы с указанием первого и третьего квартиля Me [Q1; Q3]. Для сравнения парных количественных значений использовали непараметрический критерий Манна–Уитни. Гипотезы рассматривались как статистически достоверные при  $p < 0,05$ . Для оценки диагностической ценности ИФА с использованием указанных антигенов и выбора порогового значения применяли анализ характеристической кривой (receiver-operating-characteristic curve — ROC) с вычислением площади под характеристической кривой операционной характеристики (ППК). Для корреляционного анализа рядов данных использовали метод ранговой корреляции по Спирмену.

## Результаты и обсуждение

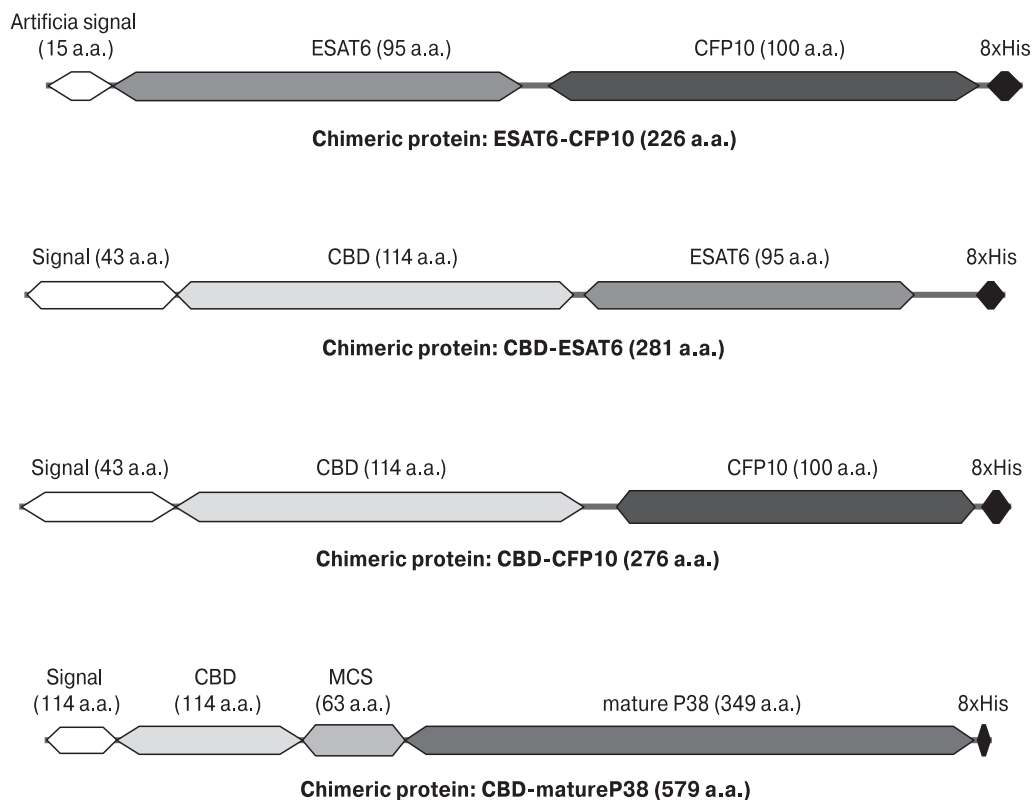
Ранее был сконструирован штамм *E. coli* Rosetta 2(DE3), содержащий рекомбинантную плазмиду pET36b<sup>(+)</sup>/p38 и продуцирующий химерный полипептид с молекулярной массой ~60 kDa. Химерный полипептид содержал в N-концевой области аминокислотную последовательность CBD<sub>СенА</sub>, в С-концевой области полную аминокислотную последовательность зрелого белка Р38 *M. tuberculosis* [2]. На долю синтезированного химерного белка приходилось ~25% от общего содержания белков в клетке.

Спроектированный нами химерный ген *esat6-cfp10*, был синтезирован фирмой DNA2.0 (США). Ген был клонирован в клетках *E. coli* BL21 (DE3) в составе вектора pJExpress401, обеспечивающего индуцируемую ИПТГ экспрессию этого гена под контролем промотора бактериофага T5. Отобранные рекомбинантные клоны анализировали на продукцию целевого белка — химерного белка ESAT6-CFP10 с помощью электрофореза лизата клеток в 12% ДСН-ПААГ. В исследованных рекомбинантных клонах наблюдался индуцируемый ИПТГ синтез полипептида с молекулярной массой ~24–25 kDa, соответствующей расчетной для химерного белка ESAT6-CFP10. На долю синтезированного химерного белка приходилось ~15% от общего содержания белков в клетке. Один из отобранных клонов использовали

как для наработки рекомбинантного химерного белка ESAT6-CFP10, так и для получения плазмиды, служившей в дальнейшей работе в качестве матрицы при амплификации синтетических генов белков ESAT6 и CFP10. Ампликоны генов белков ESAT6 и CFP10 по отдельности клонировали в составе экспрессирующего вектора pETm/*cbd* в клетках *E. coli* BL21 (DE3). В результате лигирования целевых синтетических генов с плазмидным вектором pETm/*cbd* встраиваемые ДНК «сшивались» с нуклеотидной последовательностью вектора, кодирующей целлюлозосвязывающий домен CBD<sub>СенА</sub> с образованием химерных генов *cbd-cfp10* и *cbd-esat6*. Получение рекомбинантных белков CBD-P38, CBD-ESAT6 и CBD-CFP10 в виде «сшитых» с CBD<sub>СенА</sub> химер обусловлено необходимостью увеличения сорбции рекомбинантных антигенов на полистирольном планшете за счет полипептидной цепи CBD<sub>СенА</sub>, содержащей протяженные гидрофобные участки, способствующие связыванию с гидрофобной поверхностью полистирола. На рисунке представлены схемы структур полипептидов, кодируемых сконструированными химерными генами.

Сконструированными рекомбинантными плазмидами, содержащими химерные гены, трансформировали клетки *E. coli* BL21 (DE3). Клоны, отобранные методом ПЦР колоний, исследовали на способность продуцировать целевые химерные белки, а также определяли и внутриклеточную локализацию этих белков. По данным электрофоретического анализа белков в ПААГ клоны, содержащие рекомбинантные плазмиды pETm/*cbd-cfp10* и pETm/*cbd-esat6*, продуцировали полипептиды с молекулярными массами, соответствующими расчетным для белков CBD-CFP10 и CBD-ESAT6 соответственно. На долю синтезированных белков CBD-CFP10 и CBD-ESAT6 приходилось соответственно 45 и 50% от суммарного белка клеток. Рекомбинантные белки были очищены с помощью аффинной хроматографии на колонках с Ni<sup>2+</sup>-NTA-сефарозе 6B-CL. Степень очистки составляла 90–95%. Очищенные белки были использованы в дальнейшей работе по исследованию их антигенных свойств.

Во всех образцах сывороток крови ( $n = 729$ ) с помощью непрямого варианта ИФА были определены уровни IgG-антител (ПТА) против всех антигенов. С целью определения оптимального порогового значения был проведен ROC-анализ. На основании полученных данных были построены характеристические ROC-кривые, выбраны пороговые значения при фиксированной специфичности 80% и проведен анализ частоты выявляемости патологических результатов (> порогового значения). Результаты представлены в таблице. У 44% здоровых лиц



### Рисунок. Схемы структур химерных белков

**Signal:** N-концевая лидерная аминокислотная последовательность сигнала секреции;  
**CBD:** аминокислотная последовательность целлюлозосвязывающего домена эндогликоназы A из *Cellulomonas fimi*;  
**ESAT6:** аминокислотная последовательность белка ESAT6 из *M. tuberculosis*;  
**CFP10:** аминокислотная последовательность белка CFP10 из *M. tuberculosis*;  
**Mature P38:** аминокислотная последовательность зрелого белка P38 из *M. tuberculosis*;  
**MCS:** аминокислотная последовательность, кодируемая полилинкером вектора pET36b<sup>(+)</sup>;  
**8xHis:** C-концевая аминокислотная последовательность из 8-ми гистидиновых остатков.  
 В скобках указано количество аминокислотных остатков (a.a.), входящих в полипептид.

были обнаружены ПТА хотя бы к одному антигену. Из 275 больных ТБ с бактериовыделением лишь у 13,5% результат ИФА ко всем исследуемым антигенам был отрицательным, в то время как у больных без бактериовыделения процент отрицательных результатов составил 30%. Достоверные различия между группой БЛ с бактериовыделением и с БЛ без бактериовыделения вне зависимости от стадии ТБ процесса обнаружены при определении ПТА только к PPDN-3, CBD-P38 и CBD-CFP10 ( $p < 0,0001$ ). Кроме того, использование PPDN3 позволяет достоверно различить группы БЛ и КЛ ( $p < 0,0001$ ). Следовательно PPDN3 может применяться для выявления активного ТБ. Важно отметить, что БЛ по сравнению с КЛ, имеющими высокий риск инфицирования, не отличаются между собой ( $p > 0,05$ ) по содержанию ПТА против ESAT6-CFP10 и CBD-CFP10. Для этих антигенов нет значимых различий и при сопоставлении БЛ с бактериовыделением ( $n = 271$ ) и БЛ без бактериовыделения ( $n = 50$ ). Следовательно, ESAT6-CFP10 и CBD-CFP10 могут использоваться для

выявления ТБ инфицирования (в независимости от наличия клинических проявлений ТБ и наличия бактериовыделения). У лиц с заболеваниями нетуберкулезной этиологии также были обнаружены достоверные различия по сравнению с группой БЛ при определении ПТА к PPDN-3, ESAT6-CFP10 и CBD-CFP10 ( $p < 0,05$ ).

Для того чтобы выяснить роль каждого антигена в составе антигенных композиций для диагностических тест-систем, был проведен корреляционный анализ данных об уровнях антител против каждого антигена. Проведенные расчеты выявили наличие достоверной положительной корреляции между уровнями антител против всех антигенов (CBD-P38, ESAT6-CFP10, CBD-CFP10, CBD-ESAT6, PPDN-3), которые сравнивались попарно. Это говорит о том, что у значительной части больных уровень антител к любому из пяти антигенов, по всей видимости, определяется общим уровнем гуморального иммунного ответа против *M. tuberculosis*. Но поскольку во всех случаях коэффициент

ТАБЛИЦА. ЧАСТОТА ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ В ГРУППАХ ОБСЛЕДОВАННЫХ

Группа	Статус	Число образцов	Частота положительных результатов, %				
			ESAT6-CFP10	CBD-CFP10	CBD-ESAT6	PPDN-3	CBD-P38
Пороговое значение*, OD <sub>450</sub>			0,52	0,74	1,11	0,36	0,50
Здоровые доноры		366	20	20	20	20	20
Больные ТБ	ВП БК+	128	25	37	14	57	37
	ВП БК-	39	13	21	21	16	10
	ХР БК+	147	20	30	26	78	43
	ХР БК-	7	29	14	58	58	59
	Всего	321	21	32	22	62	36
Контактные по ТБ		42	29	38	12	4	21
Саркоидоз легких		40	3	0	0	3	5
Пневмония		28	25	18	11	4	4

**Примечание.** ВП – впервые выявленные больные ТБ до начала лечения; ХР – больные хроническим ТБ; БК+/- – с наличием/отсутствием бактериовыделения, подтвержденного микроскопией или микробиологическим методом (посев мокроты); \* пороговое значение установлено при построении ROC-кривой при фиксированной специфичности 80% для каждого антигена.

корреляции Спирмена (R) не превышал 0,67 (то есть выявленная корреляция между уровнями антител к изучаемым антигенам не была абсолютной), то данные антигены отличаются в значительной степени по своим антигенным и иммунобиологическим свойствам и, вероятно, не могут заменить друг друга в составе антигенных диагностических композиций.

Поскольку чувствительность и специфичность связаны между собой обратной связью, то мы не можем вводить бесконечное количество антигенов в композицию, так как после добавления каждого последующего антигена помимо увеличения чувствительности мы наблюдаем уменьшение специфичности. Так, при совместном использовании PPDN-3, CBD-P38 и ESAT6-CFP10, чувствительность выявления БЛ, в независимости от наличия бактериовыделения, стремилась к 95%, при этом специфичность составила всего 65%. В ходе проведенного анализа было установлено, что сочетание двух антигенов PPDN-3 и CBD-P38 наименее снижает специфичность выявления ЗЛ (76%), при

этом чувствительность в разных группах возрастает, достигая 90% в группе БЛ хроническим ТБ процессом (МБТ+), 74% у БЛ с впервые выявленным ТБ (МБТ+) и 60% у БЛ (МБТ-) вне зависимости от характера процесса. Специфичность диагностики лиц с НЗЛ остается прежней в группе БЛ пневмонией (96%) и немного уменьшается в группе БЛ саркоидозом легких, составляя 92%. Таким образом, белки PPDN-3 и CBD-P38 могут найти применение в ИФА тест-системах для выявления лиц с активным ТБ процессом и проведения дифференциальной диагностики ТБ с другой легочной патологией. ESAT6-CFP10 и CBD-CFP10 могут быть использованы для разработки тестов для выявления инфицирования *M. tuberculosis*, однако необходимо решить вопрос об увеличении специфичности проведения анализа, в том числе и за счет изменения условий синтеза данных белков.

*Работа частично поддержана грантом молодых ученых ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.*

## Список литературы

1. Васильева Е.В., Вербов В.Н., Тотолян Арег А., Беклемишев А.Б., Мамаев А.Л., Цырульников А.О. Возможность использования различных антигенов *M. tuberculosis* в серодиагностике туберкулеза легких // Медицинский академический журнал. — 2012. — № 4 (12). — С. 24–26.
2. Деркачева С.А., Ткаченко В.И., Беклемишев А.Б. Получение рекомбинантного антигена р38 *M. tuberculosis* и оценка возможности его применения в серодиагностике туберкулеза // Бюллетень СО РАМН. — 2007. — № 5 (127). — С. 62–68.
3. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование // М., 1984. — 480 с.
4. Салина Т.Ю., Морозова Т.И. Иммунологические методы в дифференциальной диагностике // Туберкулез и болезни легких. — 2011. — № 11. — С. 50–53.
5. Туберкулез в Российской Федерации, 2010 г. Аналитический обзор статистических показателей, используемых в Российской Федерации. — М., 2011. — 280 с.

Ссылки 6–25 см. в References (с. 242). See References for numbers 6–25 at p. 242.

## THE SEARCH OF OPTIMAL COMBINATION OF ANTIGENS FOR SEROLOGICAL DIAGNOSTICS OF TUBERCULOSIS

Vasilyeva E.V.<sup>a</sup>, Verbov V.N.<sup>a</sup>, Beklemishev A.B.<sup>b</sup>, Mamaev A.L.<sup>b</sup>, Tsyruľ'nikov A.O.<sup>b</sup>, Stepanenko T.A.<sup>c</sup>, Ivanovskii V.B.<sup>d</sup>, Lapin S.V.<sup>e</sup>, Totolian Areg A.<sup>a</sup><sup>a</sup> Saint Petersburg Pasteur Institute, Saint Petersburg, Russian Federation<sup>b</sup> Research Institute for Biochemistry of Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk, Russian Federation<sup>c</sup> City Multiprofile hospital No. 2, St. Petersburg<sup>d</sup> City Tuberculosis Dispensary, St. Petersburg<sup>e</sup> Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** The four chimeric recombinant antigens CBD-CFP10, CBD-ESAT6, ESAT6-CFP10 and CBD-P38 contained aminoacid sequences of full-size proteins ESAT6, CFP10 and matured protein P38 of *M. tuberculosis*, joined with aminoacid sequences of cellulose bind domain of endoglucanase A (CBD) from *Cellulomonas fimi* have been obtained by gene engineering methods. Recombinant proteins were purified by affine chromatography in column with Ni-NTA-sepharose 6B-CL and as PPDN-3 were used for detection of their antigenic activity in indirect ELISA for TB serological diagnostics. The sera from patients with lung tuberculosis (n = 321), from persons who had professional contacts with TB patients (n = 42), from healthy blood donors (n = 366) and from patients with lung diseases of non-TB etiology were tested. It was detected that there was positive correlation between antibodies level for all studied antigens compared by pair. It has been demonstrated that although antigens were different by antigenic and immunobiological characteristics they add each other in the content of antigenic diagnostics compositions. Thus, all these antigens can be used in the test kits for serological diagnostics of TB. Using of these antigens will allow to detect persons infected by TB and patients with active tuberculosis.

**Key words:** *M. tuberculosis*, *E. coli*, synthetic genes, cloning, expression, P38, ESAT6, CFP10, antigenic characteristics, blood sera.

**Authors:**

**Vasilyeva E.V.** ✉, Junior Research Associate, Department of New Technologies, Laboratory of Biological Preparations, St. Petersburg Pasteur Institute.

Mira str. 14, St. Petersburg, 197101, Russian Federation.

Tel.: (812) 232-80-35 (office). Fax: (812) 325-27-10. E-mail: ev\_vasilyeva@pasteurorg.ru;

**Verbov V.N.**, PhD (Chemistry), Chief, New Technologies Department, St. Petersburg Pasteur Institute;

**Beklemishev A.B.**, PhD, MD (Biology), Professor, Chief, Laboratory of Genetic Engineering, Research Institute for Biochemistry, RAMS, Siberian Branch, Novosibirsk;

**Mamaev A.L.**, Junior Research Associate, Research Institute for Biochemistry, RAMS, Siberian Branch, Novosibirsk;

**Tsyruľ'nikov A.O.**, Junior Research Associate, Research Institute for Biochemistry, RAMS, Siberian Branch, Novosibirsk;

**Stepanenko T.A.**, PhD (Medicine), Head of the Department of Pulmonology No. 2, City Multifield Hospital No. 2, St. Petersburg;

**Ivanovskiy V.B.**, PhD (Medicine), Deputy Chief Physician on Medical Work, City Anti-Tuberculosis Dispensary, St. Petersburg;

**Lapin S.V.**, PhD (Medicine), Chief, Laboratory of Autoimmune Diagnostics, Center for Molecular Medicine, Pavlov State Medical University, St. Petersburg;

**Totolian Areg A.**, PhD, MD (Medicine), Corresponding Member of the RAMS, Deputy Director on Scientific Work, St. Petersburg Pasteur Institute.

**References**

1. Vasil'eva E.V., Verbov V.N., Totolyan Areg A., Beklemishev A.B., Mamaev A.L., Tsyruľ'nikov A.O. Vozmozhnost' ispol'zovaniya razlichnykh antigenov *M. tuberculosis* v serodiagnostike tuberkuleza legkikh [Possibilities of using of different *M. tuberculosis* antigens in serological diagnosis of lung tuberculosis]. *Meditsinskiy akademicheskii zhurnal — Medical Academic Journal*, 2012, vol. 12, no. 4, pp. 24–26.
2. Derkachiova S.A., Tkachenko V.I., Beklemishev A.B. Poluchenie rekombinantnogo antigena r38 *M. tuberculosis* i otsenka vozmozhnosti ego primeneniya v serodiagnostike tuberkuloza [Obtaining of recombinant antigen of *M. tuberculosis* and evaluation of possibilities its using in serological diagnostics of tuberculosis]. *Byulleten' SO RAMN — Bulletin of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2007, vol. 127, no. 5, pp. 62–68.
3. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. *Metody geneticheskoy inzhenerii. Molekulyarnoe klonirovanie* [Methods of gene engineering. Molecular cloning]. Moscow, 1984. 480 p.
4. Salina T.Yu., Morozova T.I. Immunologicheskie metody v differentsial'noy diagnostike [Immunological methods in differential diagnostics]. *Tuberkulez i bolezni legkikh — Tuberculosis and Lung Diseases*, 2011, no. 11, pp. 50–53.
5. Tuberkulez v Rossiyskoy Federatsii, 2010 g. Analiticheskiy obzor statisticheskikh pokazateley, ispol'zuemykh v Rossiyskoy Federatsii [Tuberculosis in the Russian Federation, 2010. Analytical review of statistical indices, used in the Russian Federation]. Moscow, 2011. 280 p.



6. Chegou N.N., Hoek K.G., Kriel M., Warren R.M., Victor T.C., Walzl G. Tuberculosis assays: past, present and future. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, 2011, vol. 9, no. 4, pp. 457–469.
7. Cole S.T., Brosch R., Parkhill J. Deciphering the biology of Mycobacterium Tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature*, 1998, vol. 393, no. 6685, pp. 537–544.
8. Davidow A., Kanaujia G.V., Shi L., Kaviar J., Guo X., Sung N., Kaplan G., Menzies D., Gennaro M.L. Antibody profiles characteristic of Mycobacterium tuberculosis infection state. *Infect. Immun.*, 2005, vol. 73, no. 10, pp. 6846–6851.
9. Ireton G.C., Greenwald R., Liang H., Esfandiari J., Lyashchenko K.P., Reed S.G. Identification of Mycobacterium tuberculosis antigens of high serodiagnostic value. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2010, vol. 17, no. 10, pp. 1539–1547.
10. Hatfield G. W., Roth D.A. Optimizing scaleup yield for protein production: Computationally Optimized DNA Assembly [CODA] and Translation Engineering. *Biotechnology Annual Review*, 2007, vol. 13, pp. 27–42.
11. 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. Assessment of five antigens from Mycobacterium tuberculosis for serodiagnosis of tuberculosis. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2011, vol. 18, no. 4, pp. 565–570.
12. Manca C., Lyashchenko K., Wiker H.G., Usai D., Colangeli R., Gennaro M.L. Molecular cloning, purification, and serological characterization of MPT63, a novel antigen secreted by Mycobacterium tuberculosis. *Infect. Immun.*, 1997, vol. 65, no. 1, pp. 16–23.
13. Min F., Zhang Y., Huang R., Li W., Wu Y., Pan J., Zhao W., Liu X. Serum antibody responses to 10 Mycobacterium tuberculosis proteins, purified protein derivative, and old tuberculin in natural and experimental tuberculosis in rhesus monkeys. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2011, vol. 18, no. 12, pp. 2154–2160.
14. Pinto L.M., Grenier J., Schumacher S.G., Denking C.M., Steingart K.R., Pai M. Immunodiagnosis of tuberculosis: state of the art. *Med. Princ. Pract.*, 2012, vol. 21, no. 1, pp. 4–13.
15. Randall L.L., Hardy S. J. S. Correlation of competence for export with lack of tertiary structure of the mature species: a study in vivo of maltose-binding protein in *E. coli*. *Cell*, 1986, vol. 46, pp. 921–928.
16. Singh S., Singh J., Kumar S., Gopinath K., Balooni V., Singh N., Mani K. Poor performance of serological tests in the diagnosis of pulmonary tuberculosis: evidence from a contact tracing field study. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3393741>, free access (accessed: 14.03.13).
17. Steingart K.R., Dendukuri N., Henry M., Schiller I., Nahid P., Hopewell P.C., Ramsay A., Pai M., Laal S. Performance of purified antigens for serodiagnosis of pulmonary tuberculosis: a meta-analysis. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2009, vol. 16, no. 2, pp. 260–276.
18. Steingart K.R., Flores L.L., Dendukuri N., Schiller I., Laal S., Ramsay A., Hopewell P.C., Pai M. Commercial serological tests for the diagnosis of active pulmonary and extrapulmonary tuberculosis: an updated systematic review and meta-analysis. *PLoS Med.*, 2011, vol. 8, no. 8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3153457>, free access (accessed: 14.03.13).
19. Wallis R.S., Pai M., Menzies D., Doherty T.M., Walzl G., Perkins M.D., Zumla A. Biomarkers and diagnostics for tuberculosis: progress, needs, and translation into practice. *Lancet*, 2010, vol. 375, iss. 9729, pp. 1920–1937.
20. Walzl G., Ronacher K., Hanekom W., Scriba T.J., Zumla A. Immunological biomarkers of tuberculosis. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, vol. 11, no. 5, pp. 343–354.
21. Weldingh K., Rosenkrands I., Okkels L.M., Doherty T.M., Andersen P. Assessing the serodiagnostic potential of 35 Mycobacterium tuberculosis proteins and identification of four novel serological antigens. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, vol. 43, no. 1, pp. 57–65.
22. Wu X., Yang Y., Zhang J., Li B., Liang Y., Zhang C., Dong M. Comparison of antibody responses to seventeen antigens from Mycobacterium tuberculosis. *Clinica Chim. Acta.*, 2010, vol. 411, iss. 19–20, pp. 1520–1528.
23. Wu X., Yang Y., Zhang J., Li B., Liang Y., Zhang C., Dong M., Cheng H., He J. Humoral immune responses against the Mycobacterium tuberculosis 38-kilodalton, MTB48, and CFP-10/ESAT-6 antigens in tuberculosis. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2010, vol. 17, no. 3, pp. 372–375.
24. Xu J.N., Chen J.P., Chen D.L. Serodiagnosis efficacy and immunogenicity of the fusion protein of Mycobacterium tuberculosis composed of the 10-kilodalton culture filtrate protein, ESAT-6, and the extracellular domain fragment of PPE68. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2012, vol. 19, no. 4, pp. 536–544.
25. Zhu C., Liu J., Ling Y., Yang H., Liu Z., Zheng R., Qin L., Hu Z. Evaluation of the clinical value of ELISA based on MPT64 antibody aptamer for serological diagnosis of pulmonary tuberculosis. *BMC Infect. Dis.*, 2012, vol. 12: 96. Available at: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/12/96>, free access (accessed: 14.03.13).

Received 26.04.2013

Revision received 27.04.2013

Accepted 30.04.2013