

# Получение рекомбинантных антигенов лептоспир с целью создания иммуноферментной тест-системы для диагностики лептоспироза

В.Н. Куликов<sup>2</sup>, А.А. Козаренко<sup>2</sup>, Н.К. Токаревич<sup>1</sup>, Н.А. Стоянова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера (zoonoses@mail.ru)

<sup>2</sup>ООО «Омникс», Санкт-Петербург

## Резюме

Методом генной инженерии получены рекомбинантные белки лептоспир.

Установлена их высокая антигенная активность и специфичность. На основе этих белков сконструирована иммуноферментная тест-система для обнаружения IgG-антител к лептоспирам.

**Ключевые слова:** лептоспироз, диагностика

## Development of Recombinant Leptospira Antigenes for the Purpose of Creation of Immunoassay Test Kit for Diagnosis of Leptospirosis

V.N. Kulikov<sup>2</sup>, A.A. Kozarenko<sup>2</sup>, N.K. Tokarevich<sup>1</sup>, N.A. Stoyanova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Saint-Petersburg Pasteur Institute (zoonoses@mail.ru)

<sup>2</sup>Limited Liability Company «Omnix», Saint-Petersburg

## Abstract

Species-specific recombinant proteins of leptospira are genetically engineered by the method of gene manipulation. Their high activity and antigenic specificity are established. On the basis of these proteins an immunoassay test kit for detecting IgG to Leptospira is constructed.

**Key words:** leptospirosis, diagnostics

## Введение

Лептоспироз является широко распространенной и социально значимой зооантропонозной инфекцией. Полиморфизм клинических проявлений лептоспироза и отсутствие патогномоничных симптомов болезни приводят к поздней диагностике, нерациональному лечению, что становится одной из причин высокой летальности при этой инфекции [1 – 3]. Относительно низкие показатели регистрируемой заболеваемости людей, несопоставимые с множественностью потенциальных источников инфекции, в большинстве стран мира, включая Россию, обусловлены неудовлетворительным состоянием лабораторной диагностики [4].

В значительной степени трудности серологической диагностики лептоспироза вызваны тем, что, как правило, она осуществляется с помощью реакции микроагглютинации (РМА), признанной Международным обществом лептоспирологов основным тестом для диагностики этой инфекции [5]. Для постановки РМА необходимо поддерживать в лабораторных условиях стандартный набор живых культур лептоспир. Культивирование лептоспир осуществляется лишь в специализированных лабораториях, поскольку это связано с большими трудностями. Кроме того, стандартизация учета результатов РМА весьма затруднительна, так как они оценивают-

ся визуально с помощью микроскопа. Сказанное аргументирует разработку лептоспирозных диагностических систем со стандартными способами оценки результатов анализа, применение которых будет возможно практически в любой серологической лаборатории. Одним из перспективных подходов к решению этой задачи является получение на основе современных методов генной инженерии родоспецифичных рекомбинантных антигенов лептоспир для конструирования на их основе диагностических тест-систем. Анализ литературных данных показал, что наиболее перспективными в данном отношении могут быть гены *lipL32*, *lipL41* и *lipL45* [6, 7].

**Цель данной работы** – получение родоспецифических белков лептоспир, пригодных для конструирования иммуноферментной тест-системы для диагностики лептоспироза.

## Материалы и методы

В работе были использованы патогенные лептоспирсы серогрупп *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola*, *Grippotyphosa* из коллекции НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера.

ДНК из лептоспир были выделены стандартным методом с использованием протеиназы К и фенолхлороформной экстракции [8]. Гены *lipL32*, *lipL41*,

*lipL45*, *ompL1*, кодирующие соответствующие липопротеины, и порин *OmpL1*, локализованные во внешней мембране лептоспир, были амплифицированы с использованием праймеров, подобранных на основании депонированных в GenBank последовательностей.

С помощью методов генной инженерии были сконструированы рекомбинантные белки, для чего полученные нуклеотидные последовательности в составе экспрессионных векторов были трансформированы в штамм-продуцент (*E. coli* BL21 (DE3)). Чистота полученных рекомбинантных белков оценивалась с помощью электрофореза в полиакрельмидном геле в денатурирующих условиях [9].

Антигенные свойства рекомбинантных белков *Lp1*, *Lp3*, *Lp5*, *Lp7* (химерные антигены, содержащие иммунореактивные эпитопы *OmpL1*, *LipL41*, *LipL32*, *LipL45* соответственно) и их комбинированная рецептура были изучены в иммуноферментной тест-системе для выявления антител к лептоспир. В качестве коньюгатов в этой системе применяли мышиные моноклональные антитела к тяжелым цепям IgG человека, коньюгированные с пероксидазой хрена (SA1-35470, Pierce). Результаты ИФА представляли в относительных единицах  $K_c$  (коэффициент сыворотки), рассчитываемого как отношение ОП исследуемой сыворотки к ОП отрицательного контроля. Интерпретация результатов ИФА:  $K_c < 1,1$  – специфические антитела к белкам лептоспир не обнаружены;  $K_c \geq 1,1$  – специфические антитела к белкам лептоспир обнаружены.

Иммуноферментному анализу были подвергнуты сыворотки крови практически здоровых доноров (87 проб), пациентов с заболеванием нелептоспирозной этиологии (сифилис – 20 проб) и сыворотки, полученные от 138 больных с лабораторно (по данным РМА) подтвержденным лептоспирозом, хранящиеся в коллекции сывороток в лаборатории зооантропонозных инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, а также сыворотки лиц, у которых клиническое течение болезни и эпидемиологический анамнез позволили предположить лептоспирозную инфекцию (84 пробы).

Постановку и учет результатов РМА выполняли по стандартной методике с набором живых культур лептоспир 13 серогрупп [10].

## Результаты и обсуждение

Установлено, что полученные рекомбинантные белки вступали в специфические взаимоотношения с сыворотками, содержащими антитела к лептоспирам, относящимся к следующим сероварам: *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola* и *Grippotyphosa*.

Антигенная активность полученных белков значительно различалась. Так, частота обнаружения IgG к белку *Lp5* в сыворотках больных лептоспирозом была значительно выше (56,0%), чем к другим рекомбинантным белкам, на протяжении всех периодов болезни и реконвалесценции. Рекомбинантный белок *Lp1* несколько уступал по анти-

генной активности белку *Lp5*. Доля сывороток, в которых были обнаружены IgG к этому белку, составляла 29,7%. Белки *Lp3* и *Lp7* выявляли IgG лишь на ранних этапах болезни – до 4-й недели включительно.

Параллельное применение рекомбинантных белков позволяет обнаруживать антитела к лептоспирам у большего количества больных в сравнении с одним, даже наиболее активным в антигенном отношении белком *Lp5*, что обосновывает целесообразность создания комплексной рецептурно-диагностической системы.

В первой серии опытов при исследовании 138 сывороток крови людей, больных лептоспирозом и содержащих, по данным РМА, антитела к лептоспирам *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola* и *Grippotyphosa*, антитела в ИФА с предлагаемым комбинированным иммunoсорбентом были выявлены в 114 пробах (82,6%). Установлено, что доля положительных результатов, полученных с помощью ИФА, была выше в сыворотках, содержащих более высокие титры антител в РМА. Так, среди сывороток, содержащих антитела, по данным РМА, в разведении 1:100 доля положительных результатов ИФА составила 37,5%, в разведении 1:200 – 62,9%, 1:400 – 71,4%, 1:800 – 77,8%, а в разведении 1:1600 – 95,7%.

Во второй серии опытов с целью проверки специфичности предлагаемого иммunoсорбента были исследованы сыворотки доноров и пациентов с заболеванием нелептоспирозной этиологии, не содержащие, по данным РМА, антител к лептоспирам. В сыворотках этих лиц с помощью ИФА антитела к лептоспирам также не были обнаружены ( $K_c < 1,1$ ).

В третьей серии опытов параллельно в РМА и ИФА были исследованы 84 сыворотки от 73-х человек с лихорадочным заболеванием неясной этиологии, клиническое течение болезни которых и эпидемиологический анамнез позволили предположить лептоспирозную инфекцию. С помощью РМА в сыворотках крови 13 больных (21 проба) обнаружены антитела к лептоспирам: у 11 больных – к *L. icterohaemorrhagiae*, у 2-х больных – к *L. canicola* в титрах 1:100 (6 проб), 1:200 (9 проб), 1:400 (5 проб), 1:800 (1 проба). IgG к лептоспирам с помощью ИФА были выявлены у 12 больных (17 сывороток).

Анализ полученных данных показал, что результаты применения обеих реакций совпали при исследовании сывороток 56 больных (76,7%) и различались у 17 пациентов (23,3%). У 4-х больных (7 сывороток) антитела выявлены в обоих тестах, а у 52-х пациентов (57 сывороток) обе реакции были отрицательными. У 8 больных, сыворотки которых были негативны в РМА, с помощью ИФА выявлены IgG. Анализ историй болезни этих больных свидетельствует о высокой вероятности лептоспирозной этиологии болезни по крайней мере у 6 из них. Так, у больного К. на пятый день болезни выявлены IgG

к лептоспирал (K<sub>c</sub> = 6,1), а на десятый день больной скончался. При этом патолого-анатомические данные подтверждают лептоспирозную инфекцию. У больного П., клиническое течение болезни которого было типично для лептоспирозной инфекции, со второй недели от начала заболевания было проведено (в течение 21-го дня) трехкратное исследование сыворотки крови в РМА, давшее отрицательные результаты. Напротив, применение ИФА в этих же сыворотках позволило выявить IgG к лептоспирал (K<sub>c</sub> = 4,2; 4,9; 4,1). Мы полагаем, что этот случай стал примером достаточно распространенного случая, описанного разными авторами, когда у больных лептоспирозом людей антитела с помощью РМА не выявляются в течение длительного периода болезни [11].

Из 9 больных, в сыворотках крови которых не были выявлены IgG к лептоспирал, а в РМА они определялись, клиническая картина соответствовала лептоспирозной природе болезни только у 4-х пациентов. У остальных 5 больных клинические и лабораторные данные свидетельствовали о другой этиологии, например о гепатите В. Вероятно, выявленные в РМА антитела у этих больных были результатом заражения лептоспиралами в прошлом,

поскольку известно, что у инфицированных данным возбудителем они могут сохраняться несколько лет [12, 13].

Из 14 больных с диагнозом, установленным на основании клинико-эпидемиологических и патолого-анатомических данных и подтвержденным одним или двумя используемыми в работе серологическими тестами, антитела к лептоспирал с помощью РМА были выявлены у 8 пациентов. Применение ИФА для выявления IgG к этому возбудителю позволило обнаружить их у 10 больных. Оба теста выявляли антитела примерно в одинаковые сроки начиная с середины второй недели болезни до 2,5 месяца (срок наблюдения).

## Выводы

1. Получены родоспецифические рекомбинантные белки лептоспирал.
2. Установлена достаточно высокая антигенная активность и специфичность полученных рекомбинантных белков лептоспирал.
3. Обоснована перспективность разработки на основе рекомбинантных белков лептоспирал диагностических препаратов.

## Литература

1. Ананьина Ю.В. Лептоспирозы людей и животных: тенденции распространения и проблемы профилактики. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2010; 2 (51): 13 – 16.
2. Майорова С.О., Стойнова Н.А., Токаревич Н.К., Федуняк И.П. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2007; 1: 12 – 15.
3. Goris M.G., Boer K.R., Duarte T.A., Kliffen S.J., Hartskeerl R.A. Human leptospirosis trends, the Netherlands, 1925 – 2008. Emerg. Infect. Dis. 2013; 19 (3): 372 – 378.
4. Ананьина Ю.В., Петров Е.М., Самсонова А.П., Земская М.С. Лептоспирозы в России: проблемы контроля и диагностики. Диагностика, профилактика и лечение лептоспироза людей и животных: Материалы московской международной конференции по лептоспирозу. Москва; 2007: 10, 11.
5. Faine S., Adler B., Bolin C., Perolat P. *Leptospira and Leptospirosis*. MediSci Australia. 1999: 272.
6. Chalayon P., Chanket P., Boonchawalit T., Chattanadee S., Srimanote P., Kalambaheti T. Leptospirosis serodiagnosis by ELISA based on recombinant outer membrane protein. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 2011 May; 105 (5): 289 – 297.
7. Cullen P.A., Xu X., Matsunaga J., Sanchez Y., Ko A.I., Haake D.A., Adler B. Surfaceome of *Leptospira* spp. Infect. Immun. 2005 Aug; 73 (8): 4853 – 4863.
8. Veloso I.F., Lopes M.T., Salas C.E., Moreira E.C. A comparison of three DNA extractive procedures with *Leptospira* for polymerase chain reaction analysis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2000 May – Jun; 95 (3): 339 – 343.
9. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227 (5259): 680 – 685.
10. Эпидемиология, диагностика и профилактика заболеваний людей лептоспирозами: Методические указания МУ 3.1.1128-02. Москва: Минздрав России; 2002.
11. Серебрякова Т.Л., Кондратенко В.Н., Ленартович Л.С. Лабораторно-клинические параллели в диагностике лептоспироза. Лептоспирозы: Материалы VIII Всесоюзной конференции по лептоспирозам. Тбилиси; 1983: 248 – 250.
12. Абрамсон Л.А., Карцева Т.С. К вопросу о длительности сохранения антител у переболевших лептоспирозом. Лептоспироз: Сб. докл. VI Всесоюз. науч. конф. по лептоспирозу. Баку; 1976: 184.
13. Негреску В.Я., Калинос В.Л. Лептоспирозные заболевания в Кишиневе и некоторые аспекты серологической диагностики этой инфекции. Лептоспирозы: Материалы VIII Всесоюзной конференции по лептоспирозам. Тбилиси; 1983: 288 – 290.

## References

1. Ananyina Yu.V. Leptospirosis of humans and animals: distribution trends and problems preventing. Epidemiology and Vaccinal Prevention. 2010; 2 (51): 13 – 16 (in Russian).
2. Mayorova S.O., Stoyanova N.A., Tokarevich N.K., Fedunyak I.P. Epidemiology and Infections Diseases. 2007; 1: 12 – 15 (in Russian).
3. Goris M.G., Boer K.R., Duarte T.A., Kliffen S.J., Hartskeerl R.A. Human leptospirosis trends, the Netherlands, 1925 – 2008. Emerg. Infect. Dis. 2013;19 (3): 372 – 378.
4. Ananyina Yu.V., Petrov E.M., Samsonova A.P., Zemskaya M.S. Leptospirosis in Russia: problems of control and diagnostics. Diagnosis, prevention and treatment of human and animal leptospirosis: Moscow intern. conf. on leptospirosis. Moscow; 2007: 10, 11 (in Russian).
5. Faine S., Adler B., Bolin C., Perolat P. *Leptospira and Leptospirosis*. MediSci Australia. 1999: 272.
6. Chalayon P., Chanket P., Boonchawalit T., Chattanadee S., Srimanote P., Kalambaheti T. Leptospirosis serodiagnosis by ELISA based on recombinant outer membrane protein. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 2011; 105 (5): 289 – 297.
7. Cullen P.A., Xu X., Matsunaga J., Sanchez Y., Ko A.I., Haake D.A., Adler B. Surfaceome of *Leptospira* spp. Infect. Immun. 2005; 73 (8): 4853 – 4863.
8. Veloso I.F., Lopes M.T., Salas C.E., Moreira E.C. A comparison of three DNA extractive procedures with *Leptospira* for polymerase chain reaction analysis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2000; 95 (3): 339 – 343.
9. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227 (5259): 680 – 685.
10. Epidemiology, diagnosis and prevention of disease in humans leptospirosis: Guidance MOU 01/03/1128-02. Moscow: Russian Ministry of Healthcare of the Russian Federation; 2002 (in Russian).
11. Serebriakova T.L., Kondratenko V.N., Lenartovich L.S. Laboratory and clinical parallels in the diagnosis of leptospirosis. Leptospirosis: Materials VIII All-Union scientific conference on leptospirosis. Tbilisi; 1983: 248 – 250 (in Russian).
12. Abramson L.A., Kartseva T.S. On the question of the duration of persistence of antibody had been ill with leptospirosis. Leptospirosis: Materials of VI All-Union scientific conference on leptospirosis. Baku; 1976: 184 (in Russian).
13. Negrescu V.Ya., Kalinos V.L. Leptospiral disease in Chisinau and some aspects of the serological diagnosis of this infection. Leptospirosis: Materials of VIII All-Union scientific conference on leptospirosis. Tbilisi; 1983: 288 – 290 (in Russian).