

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*, ВЫЯВЛЯЮЩИЕ АНТИГЕН В МОЧЕ БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

А. В. ОНЯН, В. Г. АВДИЕНКО, С. С. БАБАЯН, Т. Р. БАГДАСАРЯН, В. Я. ГЕРГЕРТ

MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*, DETECTING THE ANTIGEN IN URINE OF THE PULMONARY TUBERCULOSIS PATIENTS

A. V. ONYAN, V. G. AVDIENKO, S. S. BABAYAN, T. R. BAGDASARYAN, V. YA. GERGERT

ФГБУН «Центральный НИИ туберкулеза», г. Москва

Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, RF

В биологических жидкостях больных туберкулезом легких присутствуют протеазоустойчивые белковые и липидные микобактериальные антигены.

Получены противотуберкулезные моноклональные антитела (МАТ), реагирующие с белками, участвующими в синтезе молибдоптерина. С помощью двух МАТ, распознающих разные эпитопы на одном антигене с молекулярной массой 32, 50 и 75 кДа, создан двухсайтовый ИФА типа «сэндвич», способный выявлять микобактериальный антиген в антигенных препаратах *M. tuberculosis* и в образцах мочи больных туберкулезом. Однако специфичность этого теста невысока, так при исследовании образцов мочи был выявлен антиген у половины здоровых доноров. Это связано с тем, что в урогенитальном тракте человека присутствуют некоторые условно патогенные микроорганизмы, относящиеся к нормальной микрофлоре, с которыми перекрестно реагируют исследуемые МАТ.

Ключевые слова: микобактериальные антигены, моноклональные антитела, гибридная технология, гибридная технология.

Protease-resistant protein and lipid mycobacterial antigens are present in biological fluids of pulmonary tuberculosis patients.

Anti-tuberculosis monoclonal antibodies (MAb) reacting to proteins participating in the molybdopterin synthesis have been obtained. With the help of two MAb recognizing different epitopes on one antigen with molecular mass of 32, 50 and 75 kilodalton. With the help of which the two-site sandwich of IFA type capable of detecting the mycobacterial antigen in antigenic preparations of *M. tuberculosis* and in urine samples of tuberculosis patients. However the specificity of this test is fairly low since when testing urine samples this antigen was found in the half of healthy donors. It is due to the fact that in human urogenital tract some opportunistic pathogens are present which belong to normal bacterial population with which the tested MAb have the cross-reaction.

Key words: mycobacterial antigens, monoclonal antibodies, monoclonal antibody technology, monoclonal antibody technology.

Микобактерии в организме хозяина постоянно секретируют антигены. Присутствие некоторых антигенов в биологических жидкостях, например в моче, свидетельствует о том, что не все из них разрушаются. Однако идентификация этих антигенов накладывает определенные требования для их поиска и исследования. Если это антигены – белки, то они должны быть устойчивы к действию сериновых протеаз организма человека или представлять собой небелковые антигены (например, быть липидной природы и не разрушаться липазами).

При изучении данных литературы о выявлении микобактериальных антигенов в моче найдено упоминание о тестах, выявляющих липоарабиноманнан-В: Determine TB LAM [3] и Clearview-TB-ELISA [2]. Тест Clearview-TB-ELISA давал высокие диагностические показатели, специфичность (95-99%) и не очень высокую чувствительность (13-37%). При этом 25% пациентов с ВИЧ-инфекцией и туберкулезом без бактериовыделения (по мокроте) имели положительный ответ в тесте LAM-ELISA

в моче. Determine TB LAM позволяет найти значимые корреляции между наличием микобактерий в мокроте и концентрациями LAM в моче больных.

Поскольку эти тесты не позволяют достичь диагностической эффективности «золотого стандарта» 95% и выше, то они могут применяться только в комплексе с остальными методами диагностики туберкулеза. Тем не менее тест-системы, базирующиеся на диагностике образцов мочи, привлекательны своей неинвазивностью и, как описано выше, позволяют выявлять ложноотрицательных больных с ВИЧ-ассоциированным туберкулезом легких.

В других работах авторам удалось выявить в моче больных активным легочным туберкулезом четыре уникальных белковых антигена *M. tuberculosis*: MT1721, MT1694, MT3444 и MT2462 с молекулярными массами 35, 33, 39 и 27 кДа. Эти антигены вовлечены в активный метаболизм микобактерий. Кроме того, ген MT1721, в отличие от других генов, кодирует белок, который уникален для *Mycobacterium tuberculosis complex* и отсутствует

у других представителей рода *Mycobacterium*. Эти четыре антигена распознаются IgG-антителами и Т-лимфоцитами от больных туберкулезом и туберкулинположительных здоровых лиц. В целом они интересны в качестве потенциальных кандидатов для создания диагностических тестов, основанных на определении антигена [4].

Также описывается тест, выявляющий Rv1681 как у больных с бактериовыделением, так и без него. Поликлональные кроличьи против рекомбинантного Rv1681 IgG-антитела распознают соответствующий нативный протеин Rv1681 в микобактериальном культуральном фильтрате. Молекулярная масса распознаваемых антигенов 32, 50 и 75 кДа. Исследователи определили в ИФА наличие протеина Rv1681 в моче больных, охарактеризовав его как биомаркер активного туберкулеза [5].

Таким образом, иммунохимические исследования микобактериальных антигенов, присутствующих в биологических жидкостях больных туберкулезом, могут быть применены при создании неинвазивного теста, позволяющего диагностировать заболевание.

Цель исследования: разработать методический подход для идентификации микобактериальных антигенов в биологических жидкостях при туберкулезе легких на основе противотуберкулезных моноклональных антител (МАТ).

Материалы и методы

Мышей линии BALB/с иммунизировали в течение нескольких недель метанол-растворимой липидной фракцией *Mycobacterium tuberculosis* (вирулентный штамм H37Rv). Клетки лимфоузлов и селезенки животных с максимальным титром использовали для гибридизации с клетками миеломы X63-Ag8.6.5.3 Sp2/0.

Скрининг проводили на суспензии цельных клеток *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, а также на антигенах, выделенных из мочи больных туберкулезом легких.

МАТ были накоплены в виде культуральных супернатантов. Антитела очищали с помощью стандартного метода иммуноаффинной хроматографии на колонках с сорбентом, ковалентно связанным с белком А, белком G или белком L.

Спектр распознаваемых МАТ антигенов изучали в иммуноблоттинге (Western Blot) с антигенами *M. tuberculosis* H37Rv, расфракционированными в ДСН-ПААГ 12,5%.

Метод иммуноферментного анализа применяли при скрининге МАТ, исследовании подклассов и классов МАТ, определении изотипов выделенных МАТ, а также для определения изоэлектрической точки антигена на фракциях, полученных при изохроматофокусировании *M. tuberculosis* H37Rv

на сорбенте Mono P и, кроме того, для исследования специфичности связывания МАТ с антигенами микобактерий и бактерий: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. smegmatis*, *M. marinum*, *M. intracellulare*, *M. avium*, *M. kansasii*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus viridans*, *Candida albicans*, *Micrococcus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium parvum*.

В исследовании использовали образцы мочи от больных с фиброзно-кавернозным и инфильтративным туберкулезом легких, а также образцы мочи здоровых доноров.

Результаты исследования

Получены гибридомы 2D9, 2H11D1, 2C11, 1F1, продуцирующие антилипидные МАТ.

МАТ 2H11D1 очищали на сорбенте со стафилококковым белком G, а на сорбенте со стафилококковым белком А – антитела 2C11 и на сорбенте с белком L – антитела 2D9 и 1F1.

Классы и подклассы МАТ были исследованы в иммуноферментном анализе: 2C11 относились к подклассу IgG2a мыши, 2H11D1 – к подклассу IgG2b, а 2D9 и 1F1 – к IgM-классу. Легкие цепи МАТ относились к типу kappa.

Изоэлектрическая точка антигена, распознаваемого МАТ 2D9, лежала около pH 5,2, что подтверждалось реакцией с фракциями, полученными при изохроматофокусировании культурального фильтрата *M. tuberculosis* H37Rv на сорбенте Mono P.

Методом иммуноблоттинга, который проводили на ультразвуковом дезинтеграторе *M. tuberculosis* H37Rv, было выявлено, что МАТ 2H11D1 распознают антиген в области 25, 32 и 50 и 75 кДа, 2D9 – 32, 50 и 75 кДа, 1F1 – антигены с молекулярной массой 35 кДа (рис.). МАТ 2C11 в иммуноблоттинге не давали реакции, потому что, вероятно, связывались с конформационным эпитопом. МАТ реагируют с белком Rv1681 (50 и 75 кДа), участвующим в синтезе молибдоптерина [4].

Для исследования химической природы антигенной детерминанты, распознаваемой МАТ, антигены культурального фильтрата *M. tuberculosis* H37Rv обрабатывали протеиназой K или периодатом натрия. 1F1, 2D9 и 2H11D1 распознавали эпитоп, состоящий из белка, в отличие от 2C11, который реагировал с антигеном, содержащим маннозные углеводные остатки.

МАТ 1F1 и 2C11 реагировали с перекрестным антигеном, представленным на всех бактериях, в то время как МАТ 2H11D1 связывались с антигенами *M. tuberculosis* complex, а также с *M. kansasii* и *M. marinum*. МАТ 2D9 распознавали антиген, содержащийся во всех микобактериях (табл. 1).

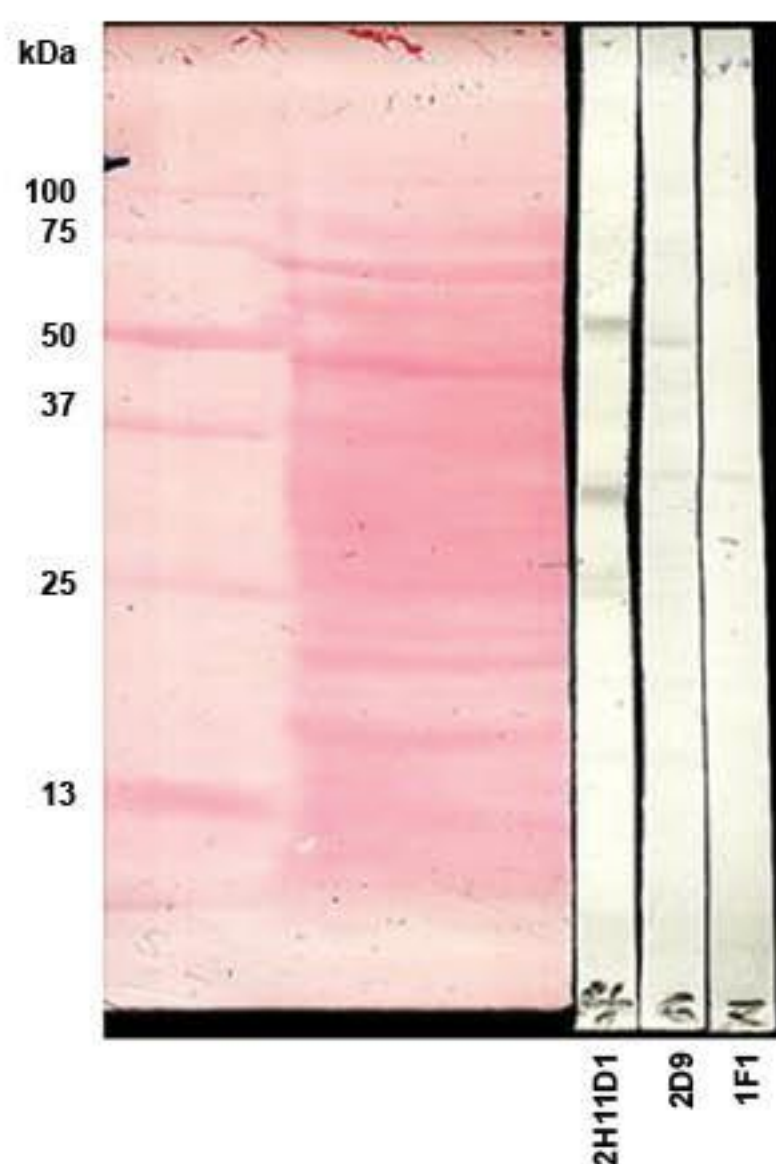


Рис. Иммуноблотинг МАТ с ультразвуковым дезинтегратором *M. tuberculosis* H37Rv

Для создания двусайтового ИФА микобактериальные антитела были изучены попарно (табл. 2).

МАТ 2С11 обладали высокой аффинностью, однако имели невысокую специфичность из-за того, что были перекрестны с антигенами всех исследуемых бактерий. Вследствие этого 2С11 не исследованы далее.

Наилучшие результаты из всех МАТ были получены для «пары» 2Н11Д1 (на твердой фазе, «capture») и 2Д9 (в качестве детектора). Они связывали антигены культурального фильтрата *M. tuberculosis* H37Rv, а также выявляли антигены в моче больных туберкулезом. Из табл. 2 видно, что при постановке двухсайтового ИФА типа «сэндвич» с 2Н11Д1 и 2Д9 удалось получить зависимость реакции от концентрации антигена. Чувствительность определения составляла 10 мкг/мл.

При исследовании образцов мочи больных и доноров с МАТ 2Д9 и 2Н11Д1 антиген был выявлен у 10 из 22 больных фиброзно-кавернозным и инфильтративным туберкулезом легких и у 5 из 10 здоровых доноров.

Заключение

С помощью гибридомной технологии получены моноклональные антитела, реагирующие как с микобактериальными антигенами, так и с антигенами в моче больных туберкулезом легких.

С помощью МАТ 2Д9 и 2Н11Д1 был создан двухсайтовый ИФА типа «сэндвич», способный выявлять микобактериальный антиген в антигенных препаратах *M. tuberculosis* и в образцах мочи больных туберкулезом.

Таблица 1

Специфичность МАТ, полученных против липидной фракции *M. tuberculosis* H37Rv

Моноклональные антитела	Molecular weight (kDa)	Изотип	Моноклональные антитела							
			<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	<i>M. bovis</i> BCG	<i>M. avium</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. marinum</i>	<i>E. coli</i>	<i>Corynebacterium</i>
2H11D1	20-25, 30-32, 50-55	IgG2b	0,009	0,002	0,003	0,002	0,002	0,002	0,003	0,002
2D9	50, 30-35	IgM	0,228	0,075	0,060	0,084	0,194	0,075	0,015	0,010
2C11		IgG2a	0,036	0,083	0,046	0,031	0,046	0,049	0,065	0,072
1F1	30-35	IgM	0,115	0,032	0,060	0,033	0,049	0,021	0,026	0,008

Подбор пар моноклональных антител в иммуноферментном анализе типа «сэндвич»

Моноклональные антитела-детекторы		Моноклональные антитела на твердой фазе ("capture")							
		2H11D1		2C11		2D9		1F1	
		Культуральный фильтрат (К.Ф.)	Моча 25%	К.Ф.	Моча 25%	К.Ф.	Моча 25%	К.Ф.	Моча 25%
2H11D1	100γ					0,050	0,032	1,540	1,845
	20γ					0,046	0,033	1,650	1,730
	4γ					0,065	0,050	1,735	1,725
2C11	100γ					0,240	0,250	1,573	1,807
	20γ					0,203	0,212	1,610	1,800
	4γ					0,220	0,251	1,690	1,780
2D9	100γ	0,015	0,425	0,051	0,279				
	20γ	0,013	0,185	0,035	0,105				
	4γ	0,012	0,060	0,039	0,080				
1F1	100γ	0,031	0,025	0,095	0,085				
	20γ	0,020	0,016	0,071	0,069				
	4γ	0,020	0,020	0,084	0,072				

МАТ 2D9 и 2H11D1 реагировали против микобактериального антигена Rv1681, участвующего в синтезе молибдоптерина.

Специфичность и чувствительность полученного теста были невысоки, поскольку выявляемый антиген определялся как в образцах мочи больных, так и здоровых доноров.

Микобактериальные антигены выводятся с мочой у больных туберкулезом легких. Однако многие антигены микобактерий перекрестны с антигенами сапрофитной и условно патогенной флоры мочеполовой системы. Так, в урогенитальном тракте человека присутствуют некоторые условно патогенные микроорганизмы, относящиеся к нормальной микрофлоре, а именно: *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *Corynebacteria*, *Peptostreptococci*, *Staphylococci*, *Streptococci*, *Bacteroides predominate*, *Torulopsis*, *Candida*, *Proteus* и *Neisseria*. Образцы мочи могут содержать до 10 000 микроорганизмов в 1 мл [1]. Поэтому полученные в данной работе МАТ, возможно, являются перекрестными с антигенами перечисленных микроорганизмов.

Это исследование подтверждает принципиальную методическую возможность создания

иммунологического теста на основе противотуберкулезных антител, способных выявлять микобактериальные антигены в биологических жидкостях больных туберкулезом легких. Получение более специфичных и высокоаффинных моноклональных антител против описанных антигенов даст возможность разработать эффективный тест для диагностики микобактериальных антигенов в моче.

ЛИТЕРАТУРА

1. Baron S. Medical Microbiology. 4th edition. University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.
2. Clinical Utility of a Commercial LAM-ELISA Assay for TB Diagnosis in HIV-Infected Patients Using Urine and Sputum Samples // PLoS ONE. – 2010. – Vol. 5, № 3. – P. 1-8.
3. HIV-associated tuberculosis: relationship between disease severity and the sensitivity of new sputum-based and urine-based diagnostic assays // BMC Med. – 2013. – Vol. 231, № 11. – P. 1-10.
4. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Ornithine Carbamyltransferase in Urine as a Possible Molecular Marker of Active Pulmonary Tuberculosis // Clin. Vac. Immunol. – 2008. – Vol. 15, № 4. – P. 638-643.
5. Validation of *Mycobacterium tuberculosis* Rv1681 Protein as a diagnostic marker of active pulmonary tuberculosis // J. Clin. Microbiol. – 2013. – Vol. 51, № 5. – P. 1367-1373.

REFERENCES

1. Baron S. Medical Microbiology. 4th edition. University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.
2. Clinical Utility of a Commercial LAM-ELISA Assay for TB Diagnosis in HIV-Infected Patients Using Urine and Sputum Samples. *PLoS One*, 2010, vol. 5, no. 3, pp. 1-8.
3. HIV-associated tuberculosis: relationship between disease severity and the sensitivity of new sputum-based and urine-based diagnostic assays. *BMC Med.*, 2013, vol. 231, no. 11, pp. 1-10.
4. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Ornithine Carboamyltransferase in Urine as a Possible Molecular Marker of Active Pulmonary Tuberculosis. *Clin. Vac. Immunol.*, 2008, vol. 15, no. 4, pp. 638-643.
5. Validation of *Mycobacterium tuberculosis* Rv1681 Protein as a diagnostic marker of active pulmonary tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*, 2013, vol. 51, no. 5, pp. 1367-1373.

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

Онян Анастасия Витальевна
ФГБУН «Центральный НИИ туберкулеза»,
младший научный сотрудник,
107564, г. Москва, ул. Яузская аллея, д. 2,
Тел.: 8 (499) 780-49-97,
E-mail: nyano90@yandex.ru

Поступила 25.06.2015