

Капитулец С. П.

Белорусский государственный медицинский университет,
г. Минск

Капитулец Н. Н.

Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,
г. Минск, Беларусь

Канашикова Т. А.

Белорусский государственный медицинский университет,
г. Минск

Молочко В. А.

Белорусский государственный медицинский университет,
г. Минск

РОЛЬ НАРУЖНЫХ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ LipL32 И LipL41 LEPTOSPIRA INTERROGANS В ГУМОРАЛЬНОМ ИММУННОМ ОТВЕТЕ ПРИ ЛЕПТОСПИРОЗЕ

В настоящее время приоритетным направлением в лабораторной диагностике лептоспироза — острой природно-очаговой зооантропонозной инфекции, характеризующейся гематогенной диссеминацией с поражением жизненно важных органов, включая почки, печень, мозг, является поиск и идентификация тех белковых структур клеточной оболочки *Leptospira interrogans*, которые являются главными иммунодоминантными антигенами и служат детерминантами патогенеза при лептоспирозе, т. е. первыми становятся мишенями для гуморального иммунного ответа. Исследования включают как биохимическую и иммунологическую, так и молекулярно-генетическую характеристику поверхностных полипептидов, их экспрессию и изоляцию при инфекции в динамике, создание генно-инженерных конструкций для получения рекомбинантных аналогов этих белков и использование их в иммунопротективных исследованиях *in vivo* для разработки иммунотерапевтических препаратов и вакцин.

Цель: изучить роль поверхностных липопротеидов LipL32 и LipL41 *L. interrogans* в развитии гуморального иммунного ответа при лептоспирозе.

Материалы и методы. В работе использовали диагностические штаммы 7 серогрупп *L. interrogans*: *Australis*, шт. Еж № 1; *Canicola*, шт. Каширский; *Grippotyphosa*, шт. Москва-5, *Hebdomadis*, шт. Свояцек; *Icterohaemorrhagiae*, шт. М-20; *Pomona*, шт. Ромона; *Tarassovi*, шт. Перепелицин. Штаммы получены из музея НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, Москва, РФ. Лептоспирры культивировали в жидкой питательной среде Терских, содержащей 5 % кроличью инактивированную сыворотку, как описано ранее [1]. Посевная доза 2×10^7 – 5×10^7 кл/мл.

Антигенные препараты лептоспир получали из 10-дневных монокультур путем последовательного двукратного центрифугирования лептоспиросодержащей жидкости (2000 об/мин, 15 мин, 10000 об/мин, 15 мин), этапов «замораживания-оттаивания» (трехкратно) и ультразвуковой обработки (частота звука 35 кГц, акустическая мощность 100 кВт/см², в течение 1 мин, трехкратно). Полученные ульт-

тразвуковые дезинтегранты подвергали центрифугированию (осветление) при 2000 об/мин, 10 мин. Концентрацию белка в надосадочной жидкости определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм. Электрофорез в 12 % полиакриламидном геле (ЭФ в ПААГ) и иммунный блоттинг (ИБ) проводили по стандартным методикам в нашей модификации [2].

Методом ИБ исследовали 15 сывороток пациентов с лабораторно и клинически подтвержденным диагнозом лептоспироз, из которых 6 сывороток были отобраны в острую фазу на 3–10-й день от начала болезни (группа I), 9 сывороток — в фазу реконвалесценции, спустя 11–35 дней болезни (группа II). Парные сыворотки для исследования были получены от 3 пациентов с интервалом 8–15 дней. Группу III составили 5 сывороток пациентов с клиническими симптомами, не исключаящими лептоспироз, но серологически негативными. В группу IV вошли сыворотки, полученные от пациентов с диагнозами ОРЗ, гепатит В, герпес, хламидиоз (всего 8). Группу V составили сыворотки здоровых доноров (4 сыворотки). Положительные сыворотки были получены из Республиканского и Минского областных центров гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья в течение 2005–2012 гг. Всего исследовано 32 сыворотки.

Результаты и обсуждение. В предварительных экспериментах были изучены электрофоретические профили структурных полипептидов диагностических штаммов *L. interrogans* (рис. 1) и определены основные иммунореактивные белки (рис. 2).

Видно, что в одномерном ЭФ в 12 % ПААГ и IgG-ИБ у всех лептоспирозных серогрупп выявляются схожие по подвижности и молекулярной массе (М.м.) мажорные антигенные полосы. Незначительный полиморфизм в подвижности отмечен лишь для специфических иммунодоминантных антигенов с М.м. 37-, 45-, 48- и 58- кДа.

На иммунных блотах сывороток пациентов с лабораторно подтвержденным лептоспирозом (группы I и II) выявлены противолептоспирозные IgG-антитела более чем к 10 доминантным иммунореактивным белкам с М.м. 14–18 кДа, 19–23 кДа, 24–30 кДа, 31 кДа, 32 кДа, 37 кДа, 41/42 кДа, 45 кДа, 48 кДа, 54 кДа, 62 кДа, 70 кДа, 76 кДа, 82 кДа и др. (рис. 3).

При этом IgG-ответ у пациентов с лептоспирозом характеризовался выраженной гетерогенностью. В острой фазе болезни (группа I) в 33,3–50 % сывороток IgG-антитела чаще выявляли против 2 мажорных наружных мембранных липопротеинов LipL32 (32 кДа) и LipL41 (41 кДа), реже — белка-шаперона GroEL (62 кДа). В сыворотках реконвалесцентом (группа II) эти показатели повышались до 88,9 % (8/9), 77,8 % (7/9) и 77,8 % (7/9) соответственно. В парных сыворотках у пациентов с лептоспирозом отмечена сероконверсия в отношении реактивности к LipL32 и LipL41 в 66,7 % (2/3), и только в 33,3 % — к GroEL (1/3). Анти-32 кДа IgG-антитела были выявлены в 3 из 5 (60 %) сывороток пациентов с возможным лептоспирозом (группа III) и у одного пациента с гепатитом В (группа IV), но отсутствовали в сыворотках здоровых доноров (группа V). Анти-41 кДа IgG-ответ также выявлен в 60 % сывороток группы III, но не отмечен в группах IV и V. Напротив,

анти-62 кДа IgG-ответ был менее специфичным и достигал 40 % и 35,5 % реактивности в группах III и IV соответственно.

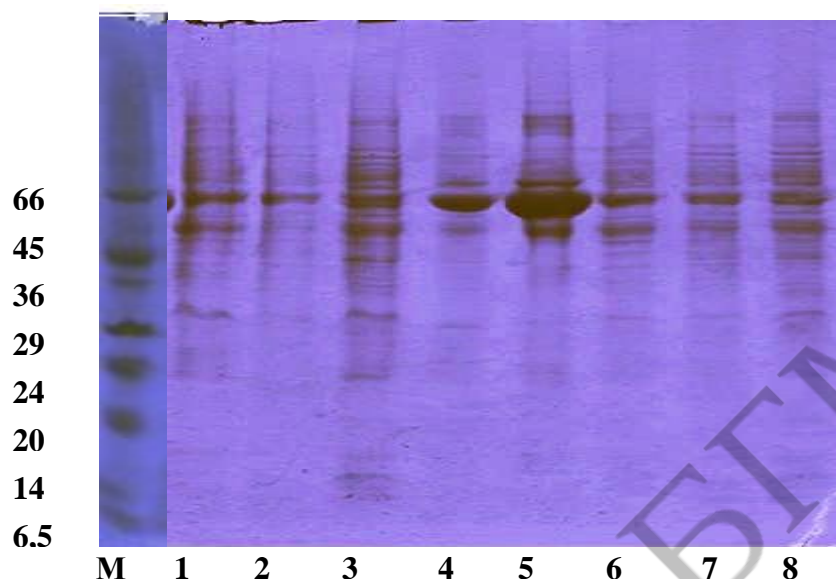


Рис. 1. Электрофоретический профиль белков моно- и комбинированного препаратов *Leptospira spp.* (М — маркерные белки):

1 — серогруппа Icterohaemorrhagiae, шт. М-20; 2 — серогруппа Hebdomadis, шт. Свояцек; 3 — серогруппа Canicola, шт. Каширский; 4 — серогруппа Pomona, шт. Помона; 5 — серогруппа Grippotyphosa, шт. Москва-5; 6 — серогруппа Tarassovi, шт. Перепелицын; 7 — серогруппа Australis, шт. Еж № 1; 8 — комплексный препарат из серогрупп Canicola + Grippotyphosa + Icterogemorrhagiae, в соотношении 1 : 1 : 1 ЭФ в 12 % ПААГ проводили при 200 В в течение 45 мин при комнатной температуре

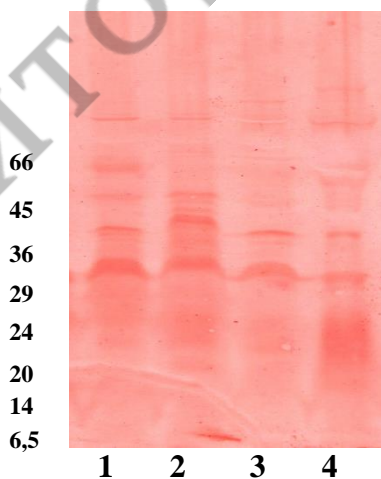


Рис. 2 Иммунореактивность лептоспирозных антигенов в IgG-ИБ:

дорожки: 1 — Australis, шт. Еж № 1; 2 — Hebdomadis, шт. Свояцек; 3 — Pomona, шт. Помона, 4 — Grippotyphosa + Canicola + Icterogemorrhagiae в соотношении 1 : 1 : 1.

Перенос белков на PDVF-мембрану проводили при силе тока 1 мА/см² в течение 3 ч. В качестве первичных антител использовали положительную противолептоспирозную сыворотку (разведение 1 : 50). Детекцию иммунореактивных белков проводили с использованием козьих противочеловеческих антител класса IgG, меченных пероксидазой хрена (A0293, Sigma), в рабочем разведении 1 : 1000

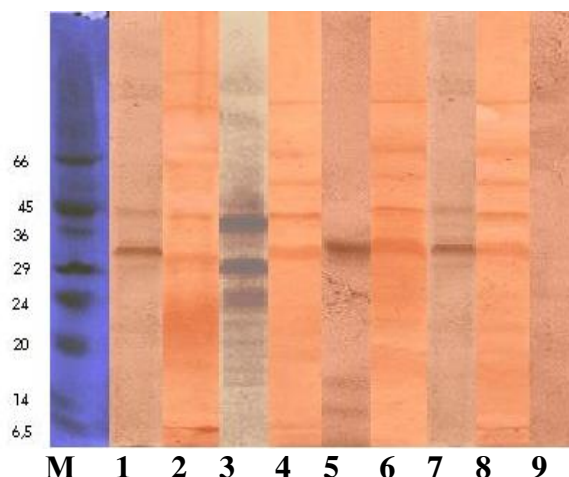


Рис. 3. Выявление IgM- и IgG-антител в сыворотках пациентов с лептоспирозом в острой фазе инфекции и фазе реконвалесценции (М — маркерные белки): дорожки: 1–4 — сыворотки пациентов, находящихся в острой фазе болезни; 5–8 — сыворотки пациентов, находящихся в фазе реконвалесценции. Блоты инкубировали с античеловеческими IgM-антителами (дорожки 1, 3, 5, 7) и IgG-антителами (дорожки 2, 4, 6, 8), меченными пероксидазой хрена; 9 — сыворотка здорового человека (донора), обработанная IgG-антителами

Существенная, хотя и менее унифицированная, иммунореактивность в сыворотках острой фазы и в сыворотках реконвалесцентов наблюдалась в IgG-ИБ против второй группы антигенов, которые включали р37, р45, р48, р76, и р82 кДа (16,7–33,4 % и 22,2–55,6 % соответственно). В заведомо отрицательных сыворотках (группы IV и V) реактивность против каждого из этих пяти антигенов не превышала 25 %.

Напротив, иммунный IgM-ответ при лептоспирозе отмечали чаще против низкомолекулярных антигенов, представленных, в основном, лептоспирозными липополисахаридами с М.м. 14–18, 19–23 и 24–30 кДа в виде диффузных полос вне зависимости от фазы болезни.

Вследствие выявленной гетерогенности IgG- и IgM-ответов в дальнейшем была оценена диагностическая значимость иммунодоминантных белков LipL32 и LipL41 и их комбинаций с другими иммунореактивными белками для повышения эффективности серодиагностики лептоспироза.

Установлено, что для сывороток острой фазы лептоспироза включение результатов иммунореактивности антигенов 41-, 62- и р76- кДа с иммунодоминантным антигеном 32 кДа увеличивало чувствительность ИБ в 3,6 раза, с 20,0 % до 71,4 %. Однако вероятность получения ложноположительных результатов при этом увеличивалась в 2,6 раза, с 7,7 до 20 %, очевидно, вследствие уменьшения специфичности ответа на антигены 62- и 76- кДа. Для сывороток фазы реконвалесценции ни одна из комбинаций антигенного ответа значительно не улучшала диагностических показателей IgG-ИБ по сравнению с единственной антигенной полосой (32 кДа). Чувствительность метода при анализе заведомо положительных сывороток достигала 100 %, тогда как специфичность только 80 %.

Проведенные исследования указывают, что главным иммунодоминантным белковым антигеном у лептоспир, выявляемым в патогенезе инфекции является

наружный мембранный липопротеин (major outer membrane protein) с М.м. 32 кДа, известный как LipL32. Это заключение согласуется с более ранними исследованиями, в которых LipL32 также был идентифицирован как основной иммунореактивный антиген [3]. В нашем исследовании сыворотки больных с лабораторно подтвержденным лептоспирозом реагировали с LipL32 чаще (88,9 %), чем с любым другим антигеном. Реактивность к LipL32 также продемонстрировала высокую специфичность: антител против LipL32 не выявлено ни в одной из заведомо отрицательных сывороток (группы IV и V). Учитывая, что LipL32 является высококонсервативным белком (97,8 % гомологии у *Leptospira spp.*) и характеризуется высоким уровнем экспрессии при инфекциях, вызванных всеми патогенными лептоспирами [4], серодиагностика заболевания, основанная на этом антигене, будет эффективной независимо от инфицирующей серогруппы.

LipL41 — наружный мембранный белок с М.м. 41 кДа, был вторым антигеном, который являлся мишенью гуморального иммунного ответа при лептоспирозной инфекции. Как и LipL32, LipL41 является липопротеином и встроен в наружную мембрану лептоспир [5], что также делает его потенциальной мишенью протективного антительного ответа [6].

Выводы:

1. Среди подтвержденных случаев лептоспироза IgG-ответ против белков *L. interrogans* обычно наблюдается к лептоспирозным антигенам в диапазоне М.м. 32–82 кДа, причем мажорные полосы отмечены для 4 белков: LipL32, LipL41, GroEL и p82.

2. IgM-ответ против лептоспирозных антигенов в сыворотках пациентов с установленным диагнозом отмечен для липополисахаридов с М.м. от 14 до 24 кДа и белков с М.м. 25 кДа, LipL32, LipL41. Эти антигены не выявлены в заведомо отрицательных сыворотках

3. Полученные данные служат основой для развития новых стратегий для серодиагностики лептоспироза. Выявление в сыворотке крови IgM- и IgG-антител против LipL32 и LipL41 является надежным критерием быстрой, простой и точной диагностики лептоспироза как на ранние сроки инфекции, так и верификации диагноза у реконвалесцентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гуморальный ответ против иммунореактивных антигенов при лептоспирозе человека, выявляемый методом иммунного блоттинга / С. П. Капитулец [и др.] // Здравоохранение. 2012. № 11. С. 39–44.

2. Инструкция о клинике, диагностике, лечении и профилактике лептоспироза // О профилактике заболеваний людей лептоспирозом : приказ МЗ РБ № 200 от 21.03.2006 г. 35 с.

3. Early Diagnosis of leptospirosis by immunoglobulin M immunoblot testing / G. Dounghawee [et al.] // Clin. Vaccine Immunol. 2008. Vol. 15, N 3. P. 492–498.

4. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection / D. A. Haake [et al.] // Infect. Immun. 2000. Vol. 68. P. 2276–2285.

5. Shang, E. S. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL41, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species / E. S. Shang, T. A. Summers, D. A. Haake // Infect. Immun. 1996. Vol. 64. P. 2322–2330.

6. *Leptospiral* outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection / D. A. Haake [et al.] // Infect. Immun. 1999. Vol. 67. P. 6572–6582.