Антитела класса М к полусинтетическому антигену *Mycobacteria leprae* – Dis-BSA у жителей эндемичного и неэндемичного регионов России

Дегтярев О.В.^{1,3}, Ротанов С.В.², Ибадулаев З.Я.³

¹ГБОУ ВПО Астраханский государственный медицинский университет Минздрава России, 414000, г. Астрахань; ²ФГБУ Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии Минздрава России, 107076, г. Москва; ³ФГБУ Научно-исследовательский институт по изучению лепры Минздрава России, 414057, г. Астрахань

Представлены данные по сравнительному изучению содержания в крови здоровых доноров антител класса М к антигену *Mycobacterium leprae*. Применена лабораторная диагностическая технология иммуноферментного анализа с использованием в качестве иммуносорбента (антигена) полусинтетического аналога видоспецифичного для *M. leprae* фенольного гликолипида-1, представленного дисахаридом, конъюгированным с бычьим сывороточным альбумином (Dis-BSA), полученным из банка ВОЗ. Установлена более высокая частота выявления антител класса М к Dis-BSA *M. leprae* в сыворотке крови у жителей Астраханской области, эндемичного по лепре региона (3,47% из 837 обследованных здоровых лиц-доноров), по сравнению с жителями Москвы и Московской области, регионом, неэндемичным по лепре (2,05% из 781 обследованных здоровых лиц-доноров). Полученные данные являются отражением интенсивности контакта населения с возбудителем данного заболевания.

Ключевые слова: лепра, иммуноферментный анализ, фенольный гликолипид-1 (ФГЛ-1), *Mycobacterium leprae*, антиген Dis-BSA, иммуноглобулины класса М.

Для цитирования: Дегтярев О.В., Ротанов С.В., Ибадулаев З.Я. Антитела класса М к полусинтетическому антигену *Mycobacteria leprae* – Dis-BSA у жителей эндемичного и неэндемичного регионов России. *Российский журнал кожных и венерических болезней*. 2015; 18(5): 56-59.

IGM ANTIBODIES TO MYCOBACTERIUM LEPRAE DIS-BSA SEMISYNTHETIC ANTIGEN IN RESIDENTS OF AN ENDEMIC AND NONENDEMIC REGIONS OF RUSSIA

Degtyarev O.V.^{1,3}, Rotanov S.V.², Ibadulaev Z.Ya.³

¹Astrakhan State Medical University, 414000, Astrakhan, Russia; ²State Center of Dermatovenereology and Cosmetology, 107076, Moscow, Russia; ³Institute of Lepra Research, 414057, Astrakhan

Blood levels of IgM antibodies to *Mycobacterium leprae* antigen were studied in healthy donors by enzyme immunoassay. Semisynthetic analog of *M. leprae* species-specific phenol glycoprotein (disaccharide conjugate with bovine serum albumin – Dis-BSA) from WHO bank served as the immunoabsorbent (antigen). The incidence of serum IgM antibodies to *M. leprae* Dis-BSA was higher in residents of the lepra endemic Astrakhan region (3,47% of 837 tested donors) in comparison with residents of Moscow and the Moscow Region, not lepra-endemic (2,05% of 781 tested donors). These data reflected the contacts of the population with the disease agent.

Key words: lepra; enzyme immunoassay; phenol glycoprotein-1 (PGL-1); *Mycobacterium leprae*; Dis-BSA antigen; IgM.

Citation: Degtyarev O.V., Rotanov S.V., Ibadulaev Z.Ya. IgM Antibodies to *Mycobacterium leprae* Dis-BSA semisynthetic antigen in residents of an endemic and nonendemic regions of Russia. *Rossiyskiy zhurnal kozhnykh i venericheskikh bolezney*. 2015; 18(5): 56-59. (in Russian)

Оптимистические прогнозы экспертов ВОЗ середины прошлого столетия в отношении ликвидации лепры в мире к 2000 г., к сожалению, не оправдались. Понятие «ликвидация лепры» при этом означало, что коэффициент распространенности этого заболевания должен составлять менее 1 случая на 10 000 человек населения. К настоящему времени ле-

пра ликвидирована только в 119 из 122 стран, где в 1985 г. эту болезнь признавали проблемой общественного здравоохранения. В некоторых регионах мира, таких как Ангола, Бразилия, Демократическая Республика Конго, Индия, Мадагаскар, Мозамбик, Непал, Объединенная Республика Танзания и Центральноафриканская Республика, лепра все еще остается серьезной проблемой общественного здравоохранения.

По официальным данным [1], предоставленным из 115 стран мира, число новых случаев заболевания лепрой, зарегистрированных в глобальных масштабах в 2012 г., составило 232 857, что на 2,7% превысило соответствующий показатель в 2011 г. – 226 626 случаев. При этом отмечено, что 220 810 (94,8%) новых случаев заболевания лепрой были выявлены в

Сведения об авторах:

Дегтярев Олег Владимирович, доктор мед. наук, профессор; Ротанов Сергей Владимирович, доктор мед. наук, доцент; Ибадулаев Загид Якубович, младший научный сотрудник (zagid30@rambler.ru).

Corresponding author:

Rotanov Sergey, MD, PhD, docent (rotanov@cnikvi.ru).

16 странах и лишь 12 047 (5,2%) – в других частях мира.

В России эпидемиологическая ситуация, связанная с распространением лепры среди населения, относительно благоприятная, заболеваемость на протяжении многих лет характеризуется устойчивым снижением и носит спорадический характер, составив в 2012 г. 0,004% [2]. В этих условиях основной задачей противолепрозной службы в низкоэндемичных регионах по лепре остается своевременное выявление новых случаев заболевания.

Для выявления случаев инфицирования или доклинических форм течения лепры среди контактных лиц и жителей эндемичных по лепре регионов используют клиническое обследование с лабораторным исследованием образцов крови с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) [3, 4]. ИФА позволяет выявлять в сыворотке крови обследуемых пациентов присутствие специфических антител классов М и/или G (IgM, IgG), вырабатываемых иммунной системой инфицированного человека.

Поэтому определенные перспективы для раннего выявления субклинических форм инфекции и/или инфицированных лиц связывают с разработкой новых наборов реагентов для ИФА, основанных на применении высокоспецифичных антигенов возбудителя заболевания, позволяющих регистрировать специфические IgM для раннего выявления лепрозной инфекции на начальных этапах ее развития.

В качестве антигена в составе иммуносорбента для ИФА при проведении научных исследований в настоящее время наиболее часто используют полусинтетический аналог специфического нативного фенольного гликолипида-1 (ФГЛ-1) *Mycobacterium leprae* в форме дисахарида, конъюгированного с бычьим сывороточным альбумином (Dis-BSA). По мнению ряда авторов [5–10], он является специфическим маркером присутствия возбудителя лепры в организме человека. При этом выявление высокого содержания антител может свидетельствовать об активном течении инфекционного процесса [10–15].

Цель исследования – изучение содержания специфических IgM к антигену Dis-BSA *M. leprae* в крови у жителей эндемичных и неэндемичных по лепре регионов Российской Федерации.

Материалы и методы

Определение IgM осуществляли методом твердофазного ИФА по Воллер [16] с вновь разработанным для этой цели составом набора реагентов.

При создании иммуносорбента в качестве твердой фазы использовали полистироловые планшеты («Мед-полимер», Санкт-Петербург), на которых сорбировали Dis-BSA – полусинтетический антиген, предоставленный из банка ВОЗ (в соответствии с Программой о сотрудничестве между ВОЗ и ФГБУ Научно-исследовательский институт по изучению лепры Минздрава России).

Концентрация антигена Dis-BSA составила 0,1 мкг/мл; иммобилизацию антигенного материала на твердую фазу осуществляли при температуре 37°C в течение 18 ч. Скрининг-титром исследуемых сывороток было выбрано разведение 1:2000, для разведения применяли фосфатно-

солевой буфер, содержащий твин-20 (ФСБ-твин 20), с добавлением 1% сыворотки крупного рогатого скота.

Положительным контролем служила сыворотка крови больного лепроматозным типом лепры в активной стадии, отрицательным контролем – стандартная инактивированная сыворотка крови здорового донора. В качестве конъюгата, позволяющего определять формирование иммунных комплексов антиген–антитело на твердой фазе, использовали антитела диагностические к иммуноглобулинам человека, меченные пероксидазой хрена ("Invitrogen", США), в рабочем разведении 1:2000; для разведения конъюгата использовали раствор Antibody Diluent Reagent Solution ("Invitrogen", США).

Субстратной смесью служил цитратный буфер (рН 4,7–5), содержащий 4 мг тетраметилбензидина и 2 мкл 0,003% перекиси водорода на 10 мл цитратно-фосфатного буферного раствора. При проведении исследования на соответствующем этапе реакции после внесения в каждую лунку по 100 мкл субстратной смеси планшеты выдерживали при комнатной температуре 30 мин, реакцию останавливали добавлением в каждую лунку по 50 мкл 2,5N раствора серной кислоты (50%). Оптическую плотность (ОП) определяли на планшетном иммуноферментном анализаторе марки Expert PLUS ("ASYS", Великобритания) при длине волны 492 нм.

В разработанном нами наборе реагентов при проведении ИФА величина показателя оптической плотности (ОП) в лунках с образцами, не содержащих антитела к антигену возбудителя лепры, варьировала в интервале от 0 до 0,3 условных оптических единиц (усл. ОЕ), а с образцами, содержащими антитела указанной специфичности, – более 0,3 усл. ОЕ.

В настоящем исследовании были использованы без применения дополнительных критериев отбора 837 образцов сыворотки крови здоровых доноров эндемичного по лепре региона Астраханской области, любезно предоставленных ГБУЗ АО Областной центр крови (Астрахань) и 781 образец сыворотки крови здоровых доноров неэндемичного по лепре региона (Москва и Московская область), полученные из ФГБУ Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica Version 6.0.437.0.

Результаты и обсуждение

ИФА с вновь разработанным нами набором реагентов 837 сывороток крови, полученных из эндемичного по лепре региона (Астраханская область), позволило получить 29 (3,47%) положительных результатов, свидетельствовавших о присутствии в этих образцах антител IgM к антигену Dis-BSA *M. leprae*, и 807 (96,53%) отрицательных результатов, которые указывали на отсутствие в этих образцах антител указанной специфичности. При этом показатели ОП положительных результатов варьировали в интервале от 0,3 до 1,0 усл. ОЕ, в среднем ($M \pm m$) $0,53 \pm 0,024$. Показатели ОП отрицательных результатов составили от 0,001 до 0,30 усл. ОЕ (в среднем $0,12 \pm 0,003$) (см. таблицу).

Аналогичное исследование с помощью ИФА 781 образца сывороток крови, предоставленных из неэндемичного по лепре региона (Москва и Московская область), позволило получить 16 (2,05%) положительных и 765 (97,95%) отрицательных результатов. При этом средние показатели ОП положи-

Результаты ИФА образцов сывороток, полученных из разных регионов Российской Федерации

Регион	Количество результатов ИФА (значение и %) с величиной показателя ОП в интервалах			
	0–0,3		0,31–1	
	абс.	%	абс.	%
Астраханская область (<i>n</i> = 836)	807	96,53	29	3,47
Московская область (<i>n</i> = 781)	765	97,95	16	2,05
<i>p</i>	< 0,001		< 0,05	

тельных результатов составили $0,52 \pm 0,033$, а отрицательных результатов – $0,10 \pm 0,003$ (см. таблицу).

Обнаружение в сыворотке крови обследуемых групп людей антител к специфичному для *M. leprae* антигену, представленному в форме Dis-BSA, по нашему мнению, свидетельствует о свершившемся контакте этих лиц с возбудителем лепры. Однако данный контакт у части обследованных доноров, может быть реализован в латентную инфекцию или бактерионосительство без клинических признаков заболевания. В дальнейшем у данной категории обследованных при наличии дефекта иммунной системы или возникновении других отягощающих обстоятельств возможно развитие клинических форм активной лепры.

Сопоставление количественного и качественного показателей результатов лабораторного исследования образцов крови, полученных от жителей субъектов Российской Федерации, различающихся по отношению к регионам эндемичным и неэндемичным по уровню заболеваемости лепрой, позволило установить определенные различия. Так, общее количество положительных результатов при ИФА (определение антител к Dis-BSA *M. leprae*) обнаружили у 3,47% жителей Астраханской области (эндемичной по лепре), что было статистически значимо выше ($p < 0,001$), чем аналогичный показатель, полученный при исследовании образцов крови у 2,05% обследованных жителей Москвы и Московской области, региону, неэндемичному по лепре.

Кроме этого, показатели величины ОП положительных результатов ИФА образцов из эндемичного по лепре региона ($0,53 \pm 0,024$) были выше соответствующих значений, полученных в образцах из неэндемичного региона ($0,52 \pm 0,033$) ($p < 0,05$). Этот факт свидетельствует о более высоком уровне содержания специфических антител в этих образцах, что является отражением более напряженного гуморального иммунного ответа, обусловленного частотой и длительностью контакта с возбудителем лепры.

Изучение величины средних показателей ОП отрицательных результатов ИФА также показало более высокие значения в образцах, представленных из эндемичного региона ($0,12 \pm 0,003$), чем в образцах сыворотки крови из неэндемичного региона ($0,10 \pm 0,003$) ($p < 0,001$).

Схожие результаты наблюдали S. Chanteau и соавт. [17], P. Klatser и соавт. [18], J. Douglas и соавт. [19], которые показали, что обнаружение специфических антител в сыворотках крови у жителей эндемичных по лепре регионов может свидетельствовать о наличии контакта этих лиц с возбудителем лепры независимо от появления клинических признаков заболевания, а количественные характеристики содержания антител в крови (титры антител) коррелируют с уровнем контакта с *M. leprae* в обществе в целом.

Анализ научных публикаций позволил нам также отметить, что высокое содержание IgM к антигену ФГЛ-1 в крови жителей эндемичных регионов коррелировало с более высоким риском развития у них активной клинической инфекции [7, 10, 20–23].

Таким образом, разработанный нами набор реagenтов для ИФА, включающий иммуносорбент, содержащий антиген Dis-BSA *M. leprae*, позволяет в сыворотке крови человека определять антитела IgM указанной специфичности, что направлено на более раннее выявление инфицированных лиц и разработку мероприятий по их клинико-серологическому диспансерному наблюдению.

Различия в результатах исследования образцов крови, полученных из эндемичного и неэндемичного по лепре регионов Российской Федерации, позволило установить более частое определение и более высокое содержание специфических антител к антигену Dis-BSA *M. leprae* в крови жителей без клинических проявлений активного течения лепры (здоровых доноров крови), что является отражением более высокого уровня контакта населения в данных регионах с возбудителем лепры. При этом показатель серопозитивности в иммунологических тестах (ИФА) не совпадает с показателями заболеваемости и распространения лепры в данном регионе, т.е. инфицирование человека не всегда приводит к развитию клинического проявления заболевания. Контакт с возбудителем стимулирует иммунологический гуморальный ответ, выражающийся в выработке специфических антител. При возникновении погрешностей в функционировании иммунной системы бактерионосительство или реинфицирование может привести к развитию активных клинических форм лепры.

ЛИТЕРАТУРА [REFERENCES]

1. Информационный бюллетень ВОЗ 2014 (Январь) № 101. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs101/ru> [Newsletter of the who 2014 (January) №101]. (in Russian) Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs101/ru>
2. Материалы Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы клинической и экспериментальной лепрологии», Астрахань, 10–11 октября 2013 г. Астрахань; 2013.
3. [Abstracts of the International scientifically-practical conference «Actual problems of clinical and experimental leprology», Astrahan, 10–11 oct. 2013. Astrahan; 2013]. (in Russian)
3. Klatser P.R. Serology of leprosy. *Trop. Geogr. Med.* 1994; 46(2): 115–8.
4. Shah D.H., Vartak R.R., Naik S.S., Dandekar S.R., Ganapati R. Epidemiological studies in children of a low endemic region, a high-endemic region, and dwellers of a leprosy colony: evaluation of anti-ND-BSA antibodies and lepromin response. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 1994; 62(4): 539–46.
5. Burgess P.J., Fine P.E., Ponnighaus J.M., Draper C. Serological tests in leprosy. The sensitivity, specificity and predictive value

- of ELISA tests based on phenolic glycolipid antigens and the implications for their use in epidemiological studies. *Epidemiol. Infect.* 1988; 101(1): 159–71.
6. Zenha E.M., Ferreira M.A., Foss N.T. Use of anti-PGL-1 antibodies to monitor therapy regimes in leprosy patients. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2009; 42(10): 968–72.
 7. Frota C.C., Freitas M.V., Foss N.T., Lima L.N., Rodrigues L.C., Barreto M.L., et al. Seropositivity to anti-phenolic glycolipid-I in leprosy cases, contacts and no known contacts of leprosy in an endemic and a non-endemic area in Northeast Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2010; 104(7): 490–5.
 8. Hunter S.W., Fujiwara T., Brennan P.J. Structure and antigenicity of the major specific glycolipid antigen of *Mycobacterium leprae*. *J. Biol. Chem.* 1982; 257(24): 15072–78.
 9. Cho S.N., Yanagihara D.L., Hunter S.W., Gelber R.H., Brennan P.J. Serological specificity of phenolic glycolipid-I from *Mycobacterium leprae* and use in serodiagnosis of leprosy. *Infect. Immun.* 1983; 41(3): 1077–83.
 10. Foss N.T., Callera F., Alberto F.L. Anti-PGL-1 levels in leprosy patients and their contacts. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1993; 26: 43–51.
 11. Chin-a-Lien R.A., Faber W.R., van Rens M.M., Leiker D.L., Naafs B., Klatser P.R. Follow-up of multibacillary leprosy patients using a phenolic glycolipid-I based ELISA. Do increasing ELISA-values after discontinuation of treatment indicate relapse? *Lepr. Rev.* 1992; 63(1): 21–7.
 12. Goulart I.M., Penna G.O., Cunha G. Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium leprae*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2002; 35(4): 365–75.
 13. Дегтярев О.В., Дячина М.Н., Дуйко, В.В., Паршин М.П. Прогностическое значение сероэпидемиологического обследования при лепре. *Туберкулез и болезни легких.* 1995; 2: 35–7.
 - [Degtyarev O.V., Dyachina M.N., Duiyko, V.V., Parshin M.P. Prognostic value of seroepidemiological surveys in leprosy. *Tuberkulez i bolezni legkikh.* 1995; 2: 35–7]. (in Russian)
 14. Дегтярев О.В., Дуйко В.В., Дячина М.Н., Ибадулаев З.Я. Серологический мониторинг больных лепрой как критерий излеченности и контроля за эпидемиологической ситуацией. *Российский журнал кожных и венерических болезней.* 2013; 4: 29–32.
 - [Degtyarev O.V. Duiyko V.V., Dyachina M.N., Ibadulaev Z.Ya. Serological monitoring of patients with leprosy as criterion of cure and epidemiological situation control. *Rossiyskiy zhurnal kozhnykh i venericheskikh bolezney.* 2013; 4: 29–32]. (in Russian)
 15. Дегтярев О.В. Особенности серодиагностики у больных лепрой в стадии клинического регресса. *Вестник дерматологии и венерологии.* 2005; 5: 23–9.
 - [Degtyarev O.V. Features serodiagnosis of leprosy in patients in clinical stage regression. *Vestnik dermatologii i venerologii.* 2005; 5: 23–9]. (in Russian)
 16. Voller A., Bidwell D.E., Bartlett A. Enzyme immunoassays in diagnostic medicines. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 1976; 53(1): 55–65.
 17. Chanteau S., Cartel J.L., Guidi C., Plichart R., Bach M.A. Seroprevalence study on 724 household contacts of leprosy patients in French Polynesia using disaccharide-octyl-BSA as antigen. *Int. J. Lepr. Other. Mycobact. Dis.* 1987; 55(4): 626–32.
 18. Klatser P.R., Cho S.N., Brennan P.J. The contribution of serological tests to leprosy control. *Int. J. Lepr. Other. Mycobact. Dis.* 1996; 64(Suppl. 4): S63–6.
 19. Douglas J.T., Worth R.M. Field evaluation of an ELISA to detect antibody in leprosy patients and their contacts. *Int. J. Lepr. Other. Mycobact. Dis.* 1984; 52(1): 26–33.
 20. Bazan-Furini R., Motta A.C., Simro J.C.L., Tarquinnio D.C., Marques W.Jr., Barbosa M.H., Foss N.T. Early detection of leprosy by examination of household contacts, determination of serum anti-PGL-1 antibodies and consanguinity. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2011; 106(5): 536–40.
 21. Cardona-Castro N.M., Restrepo-Jaramillo S., Gil de la Ossa M., Brennan P.J. Infection by *Mycobacterium leprae* of household contacts of lepromatous leprosy patients from a post-elimination leprosy region of Colombia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2005; 100(7): 703–7.
 22. Cardona-Castro N.M., Beltran-Alzate J.C., Manrique-Hernandez R. Survey to identify *Mycobacterium leprae*-infected household contacts of patients from prevalent regions of leprosy in Colombia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2008; 103(4): 332–6.
 23. Dessunti E.M., Soubhia Z., Alves E., Aranda C.M., Barro M.P. Leprosy: control of household contacts in the municipality of Londrina-PR for a ten-year period. *Rev. Bras. Enferm.* 2008; 61(Spec No): 689–93.

Поступила 26.12.14

Received 26.12.14

АППАРАТНАЯ ТЕРАПИЯ В ДЕРМАТОЛОГИИ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 615.849.19.03:616.5-003.85].036.8

Сравнение клинической эффективности эксимерных лампы и лазера при витилиго: рандомизированное исследование

Пинсон И.Я., Олисова О.Ю., Башлакова К.А.

Кафедра кожных венерических болезней (зав. – проф. О.Ю.Олисова) ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, 119991, г. Москва, Россия

И эксимерный лазер длиной волны 308 нм, и эксимерная лампа длиной волны 308 нм продемонстрировали эффективность в лечении витилиго, но прямое сравнение эффективности их воздействия никогда не проводилось. Цель работы – оценить эффективность фототерапии эксимерных лазера и лампы для лечения ограниченных форм витилиго. Проведено рандомизированное исследование. Один очаг поражения обрабатывали эксимерным лазером длиной волны 308 нм, а другой симметричный очаг – эксимерной лампой длиной волны 308 нм. Очаги обрабатывали 3 раза в неделю одинаковыми дозами на обеих сторонах в течение 20 процедур. Оценку проводили двумя независимыми группами врачей дерматологов, которые не знали особенностей лечения, с использованием фотографий при обычном свете и с использованием лампы Вуда. В исследование включены 50 пациентов, обработано 100 очагов поражения – по 2 очага у каждого пациента. Оба метода лечения показали сходные результаты с точки зрения эффективности репигментации, как минимум на 50% ($p = 0,006$). Эксимерная лампа и эксимерный лазер длиной волны 308 нм показали сходную эффективность в лечении витилиго. При одинаковой плотности энергии лампа вызывает более выраженную эритему, что указывает на фотобиологические различия между двумя устройствами.