

## ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Королёва-Ушакова А.Г., Баранова Е.В., Игнатов С.Г., Федюкина Г.Н., Соловьёв П.В., Коломбет Л.В., Бикетов С.Ф.

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ГЛИКОКОНЬЮГАТОВ В КАЧЕСТВЕ КОМПОНЕНТОВ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ТЕСТОВ ДЛЯ УСКОРЕННОЙ СЕРОДИАГНОСТИКИ ЛЕПРЫ

ФБУН ГНЦ ПМБ «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора; 142279, п. Оболенск, Московская обл., Серпуховский район, Россия

Были синтезированы гликоконъюгаты с БСА (бычьим сывороточным альбумином) с использованием следующих углеводов: дисахаридного фрагмента *M. leprae* ФГЛ-1 (фенольного гликолипида-1); комплекса дисахаридного фрагмента ФГЛ-1 и разветвлённого гексасахаридного фрагмента ЛАМ (липоарабиноманна *M. tuberculosis*); диарабинофуранозного фрагмента ЛАМ. Гликоконъюгаты использовали в качестве антигенных компонентов для конструирования серологических экспресс-тестов в иммунохроматографическом формате (ИХ-тестов). Результаты анализа сывороток больных лепрой, контактных по лепре лиц и здоровых доноров указывают на то, что наиболее перспективным антигенным компонентом является конъюгат БСА с двумя синтетическими эпитопами - дисахаридным производным ФГЛ-1 и разветвлённым гексасахаридным фрагментом ЛАМ. Этот конъюгат обеспечил наилучшую диагностическую чувствительность ИХ-тестов при основных формах лепры - малоациллярной (PB) и мультиациллярной (MB).

**Ключевые слова:** *Mycobacterium leprae*; лепра; гликоконъюгаты; иммунохроматографический анализ; серодиагностика.

**Для цитирования:** Королёва-Ушакова А.Г., Баранова Е.В., Игнатов С.Г., Федюкина Г.Н., Соловьёв П.В., Коломбет Л.В., Бикетов С.Ф. Использование синтетических гликоконъюгатов в качестве компонентов иммунохроматографических тестов для ускоренной серодиагностики лепры. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (5): 289-293. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-5-289-293>

*Korolyova-Ushakova A.G., Baranova E.V., Ignatov S.G., Fedyukina G.N., Solov'ev P.V., Kolombet L.V., Biketov S.F.*

#### THE USE OF SYNTHETIC GLYCOCONJUGATES AS COMPONENTS OF THE IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST FOR RAPID SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF LEPROSY

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. 142279, Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russia

*The glycoconjugates with BSA (bovine serum albumin) were synthesized using a next saccharide: disaccharide derivative *M. leprae* PGL-1 (phenolic glycolipid-1); a complex of the disaccharide fragment and the branched hexasaccharide fragment LAM (lipoarabinomannan); diaraabinofuranose fragment LAM. These glycoconjugates were used as antigenic components for leprosy rapid serotest construction in immunochromatographic format (leprosy LF serotest). The data obtained with sera of leprosy patients, patients who have been in contact with leprosy, and healthy donors indicate that the most promising antigenic component is a BSA conjugate with two synthetic epitopes - a disaccharide derivative of PGL-1 and a branched hexasaccharide fragment of LAM. The leprosy LF serotest with such glycoconjugate demonstrated the greatest diagnostic sensitivity for main forms of leprosy - paucibacillary (PB) and multibacillary (MB).*

**Key words:** *Mycobacterium leprae*; leprosy; glycoconjugates; LF tests, serodiagnosis.

**For citation:** *Korolyova-Ushakova A.G., Baranova E.V., Ignatov S.G., Fedyukina G.N., Solov'ev P.V., Kolombet L.V., Biketov S.F. The use of synthetic glycoconjugates as components of the immunochromatographic test for rapid serological diagnosis of leprosy. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2020; 65 (5): 289-293. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-5-289-293>*

**For correspondence:** *Korolyova-Ushakova A.G.*, junior researcher of the department of immunobiochemistry of pathogen microorganisms; e-mail: [korolyovaushakova@mail.ru](mailto:korolyovaushakova@mail.ru)

#### Information about authors:

Королёва-Ушакова А.Г., <https://orcid.org/0000-0002-0851-9902>

Баранова Е.В., <https://orcid.org/0000-0002-6455-5756>

Игнатов С.Г., <https://orcid.org/0000-0003-1755>

Федюкина Г.Н., <https://orcid.org/0000-0002-7737>

Соловьёв П.В., <https://orcid.org/0000-0001-7355-8396>

Бикетов С.Ф., <https://orcid.org/0000-0003-1179-6895>

Коломбет Л.В., <https://orcid.org/6602368837>

**Conflict of interests.** *The authors declare the absence of conflict of interests.*

**Acknowledgment.** *The study had no sponsor support.*

Received 28.01.2020  
Accepted 14.02.2020

**Для корреспонденции:** *Гильмиярова Фрида Насыровна*, заслуженный деятель науки РФ, д-р мед.наук, проф. каф. фундаментальной и клин. биохимии с лабораторной диагностикой; e-mail: [bio-sam@yandex.ru](mailto:bio-sam@yandex.ru)

**Введение.** Лепра (проказа, болезнь Хансена) — хроническое инфекционное заболевание из группы микобактериозов, вызываемое *M. leprae*, характеризующееся поражением производных эктодермы — кожных покровов, слизистых оболочек и периферической нервной системы; продолжительным инкубационным периодом, рецидивирующим течением, нередко приводящим к инвалидизации.

По официальным данным ВОЗ число зарегистрированных случаев заболевания лепрой в 2018 г. составило 211 009. Несмотря на мировую тенденцию к снижению заболеваемости лепрой, в эпидемических очагах продолжают выявляться новые случаи лепры. Заболевание относится к эндемичным в 53 странах мира, преимущественно в странах с жарким и влажным климатом (Юго-Восточная Азия, Африка, Южная и Центральная Америка), где проживает почти 2 млрд. людей. В настоящее время основное количество заболевших (всего в мире около 200 тыс. в год) приходится на страны Юго-Восточной Азии (Индия — 120 тыс. случаев в год), Латинской Америки и Африки. На территории России эндемичными очагами по лепре считаются дельта Волги и Северный Кавказ, продолжают выявляться новые случаи заболеваемости и в странах ближнего зарубежья (Казахстан и Узбекистан), которые носят устойчивый спорадический характер [1].

Классификации форм лепры, которых было предложено несколько, базируются на клинических, бактериологических, иммунологических и гистологических критериях этого сложного заболевания. Наиболее часто используют классификацию, предложенную ВОЗ, и ориентированную на лечебные цели. В ее основе лежит деление лепры на две формы: малобациллярную (РВ) и мультибациллярную (МВ). Пациенты с первой формой имеют от одного до пяти поражений на коже, а пациенты со второй формой — шесть и более поражений.

Основными лабораторными методами диагностики лепры являются бактериоскопическое исследование, патогистологическое исследование кожи, взятой из края очага поражения, лепроминовая проба (проба Митсуды), постановка функциональных проб в очагах кожных поражений. Однако данные методы имеют ряд недостатков, включая очень низкую чувствительность, и не всегда позволяют подтвердить диагноз лепры на ранних стадиях заболевания. Этим недостатком лишён метод ПЦР (полимеразная цепная реакция), который чрезвычайно чувствителен и специфичен, но он требует оборудованной лаборатории и подготовленного персонала, что не всегда выполнимо в развивающихся странах [1, 2].

В связи с этим внимание медиков было обращено на серодиагностику лепры, которая может осуществляться в условиях недостаточного медицинского обеспечения. Показано, что при лепре антительный иммунный ответ в основном направлен на родо- и видоспецифические антигены, такие как ЛАМ (липоарабиноманнан) и ФГЛ-1 (фенольный гликолипид-1) [3, 4]. Целые молекулы этих антигенов дороги в получении и склонны к неспецифическому

взаимодействию, поэтому в серологии используют отдельные эпитопы, которые частично или полностью синтезируют химически. Для иммунореактивности синтетические углеводные эпитопы необходимо конъюгировать с белковым носителем, в роли которых наиболее часто используют бычий или человеческий альбумины. В серодиагностике лепры методом иммуноферментного анализа (ИФА) достаточно давно используют конъюгаты полусинтетического или синтетического аналогов специфического углеводного эпитопа из ФГЛ-1 *M. leprae* с бычьим сывороточным альбумином [5]. Недостатком подобных тест-систем, использующих в качестве антигена аналоги углеводного эпитопа из ФГЛ-1, является выявление антител лишь к одному эпитопу, в то время как антительный ответ при лепре направлен против нескольких антигенов. Поэтому для серодиагностики различных форм лепры используют разные микобактериальные антигены, в частности, ФГЛ-1, ND-O-BSA, LID-1 [6]. Также были предприняты попытки объединения нескольких эпитопов путем генетического слияния рекомбинантных лепрозных белковых антигенов. Однако в целом экспериментальные ИФА тест-системы на основе белковых антигенов уступают по чувствительности тестам на основе углеводных эпитопов [7].

Следует отметить, что, как и ПЦР, ИФА требует использования специального оборудования, расходных материалов и высококвалифицированного персонала. В последние десятилетия наиболее активно развивается серодиагностика в формате иммунохроматографических тестов (ИХ - тестов), что обусловлено их низкой стоимостью, скоростью проведения реакции (10-15 мин), возможностью использования метода в полевых условиях и визуальной оценки результатов [8,9]. Показано совпадение результатов, полученных с использованием ИХ-теста и ИФА, выявляющих IgM к ФГЛ-1 в 91% случаев при испытаниях на 739 образцах сывороток, собранных в высокоэндемичных районах Бразилии, Индонезии, Филиппин и Ганы, а так же в Нидерландах. Однако все перечисленные выше тесты показывают достаточно высокую чувствительность лишь для выявления МВ больных (94-97%) и существенно ниже в случае РВ и субклинических форм [10]. Хотя признано, что выявление серопозитивных контактных лиц позволит с высокой вероятностью прогнозировать их заболеваемость и повысить эффективность лечебных и профилактических мероприятий, до сих пор в практике нет экспрессных методов диагностики субклинических форм. Существуют лишь экспериментальные разработки тестов на основе цитокинов, которые могут быть перспективны при различных формах лепры, включая РВ форму лепры [11].

Ранее мы получили новые серодиагностические антигены путем синтеза нескольких микобактериальных углеводных эпитопов и конъюгирования их с БСА по отдельности и в комплексе. На основе таких гликопротеинов было проведено конструирование и предварительная оценка возможностей ИХ-тестов по серодиагностике различных форм лепры с использо-

ванием сывороток крови больных лепрой, контактных по лепре лиц и здоровых доноров [12]

**Материал и методы. Антигенные конъюгаты.**

Для конструирования ИХ-тестов использовали конъюгаты синтетических углеводных эпитопов видоспецифического антигена ФГЛ-1 и родоспецифического антигена ЛАМ микобактерий с БСА [12]:

- конъюгат на основе дисахаридного производного ФГЛ-1 (ФГЛ-1-БСА);
- конъюгат на основе синтезированного комплекса дисахаридного производного ФГЛ-1 и разветвлённого гексасахаридного фрагмента ЛАМ (ФГЛ-1/ЛАМ-БСА);
- конъюгат на основе диарабинофуранозного производного ЛАМ (ЛАМ-БСА).

**Конъюгат коллоидного золота (КЗ) против IgM человека.** Синтез КЗ проводили по методу Туркевича и Френса [13,14].

Размер золотых частиц оценивали методом W. Haïssy [15]. Оптимальную концентрацию иммуноглобулинов для конъюгирования с частицами золота определяли по методике Германсон [16].

Для конъюгирования к 10 мл КЗ с диаметром частиц 20 нм добавляли свежеприготовленный 1 %  $K_2CO_3$ , доводя рН до 7,0. После этого к смеси добавляли водный раствор козьих иммуноглобулинов G против иммуноглобулинов M человека (Affini-Pure Goat Anti-Human IgM, Fc<sub>γ</sub>μ Fragment Specific (JacksonImmunoResearch)) в оптимальной концентрации и инкубировали при перемешивании 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляли БСА до конечной концентрации 0,25%. Частицы с иммобилизованным белком отделяли центрифугированием при 20 000 g в течение 30 мин, далее дважды промывали в 0,01M фосфатно-солевом буфере (ФБР), рН 7,4, содержащем 0,3% БСА. После отбора супернатанта, осадок ресуспендировали в 1,5 мл буфера, содержащем 0,02 M трис, рН 8,2, 1% сахарозу, 1% БСА, 0,02% Твин-20 и 0,01% азид натрия. Полученный продукт разделяли на аликвоты по 50 мкл и хранили в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С.

**Иммунохроматографические тесты (ИХ-тесты).** Для конструирования ИХ-тестов в формате «deep stick» использовали материалы производства «Advanced Microdevices», Индия: нитроцеллюлозную мембрану пористостью 10 мкм на подложке TYPE-CNPF-SN12-L2-H50; стекловолоконный фильтр TYPE-PT-R5; сорбирующую подушечку

(TYPE-GFB-R4(0.35)); поглощающую подушечку (TYPE-AP 045). Растворы микобактериальных антигенных конъюгатов в ФБР для формирования аналитической зоны и раствор кроличьих иммуноглобулинов против козьих иммуноглобулинов («ИМТЕК», Россия) для формирования контрольной зоны наносили с помощью диспенсера IsoFlow («Imagene Technology», США) на нитроцеллюлозные мембраны в концентрации 0,5 мг/мл, со скоростью нанесения 4 мм/сек и объемом 0,2 мкл/мм. В качестве стабилизирующих добавок использовали 10-20 % глицерин, 1 % БСА, 0,01 % азид натрия. Раствор конъюгата КЗ с козьими IgG против IgM человека наносили на стекловолоконный фильтр со скоростью 8 мм/сек и в объеме 1,6 мкл/мм. Сушку мембран и фильтров с нанесенными реагентами проводили в климатической камере («Mettmert», Германия) при температуре (25±2) °С и влажности 25%. Собранный мультимембранный композит нарезали на полоски с помощью автоматического гильотинного нарезчика Index Cutter («A-Point Technologies», США) и упаковывали в пластиковые пробирки с помощью вакуумного упаковщика Voxel 35 («Henkelman», Голландия). Изготовленные ИХ-тесты хранили в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С.

**Образцы сывороток крови.** Для проверки ИХ-тестов использовали 22 сыворотки крови пациентов с многобактериальной формой лепры (МВ); 10 сывороток крови пациентов с малобактериальной формой лепры (РВ); 5 сывороток от контактных по лепре лиц (с неподтверждённым диагнозом лепры); 20 сывороток от здоровых доноров. Сыворотки были охарактеризованы, паспортизованы и получены из коллекции сывороток крови ФГБУ «НИИЛ» г. Астрахань.

**Постановка иммунохроматографического анализа.** Анализ проводили в трех повторностях. Необходимое количество ИХ-тестов выдерживали при комнатной температуре 15 минут. Сыворотки размораживали, разводили в 10 раз в 0,1 мл ФБР, рН 7,4 и вносили в лунку 96-луночного планшета. Затем в лунку вертикально погружали ИХ-тест и выдерживали в течение 15 мин, после чего тест извлекали, помещали на горизонтальную поверхность и проводили визуальный учёт результатов.

**Результаты и обсуждение.** Иммунохроматографический анализ 22 образцов сывороток крови больных многобактериальной формой лепры с вновь разработанными ИХ-тестами на основе трех синтетических гликоконъюгатов позволил получить 21 поло-

Результаты иммунохроматографического анализа с использованием экспериментальных образцов ИХ-тестов для ускоренной серодиагностики лепры

ИХ-тест для ускоренной серодиагностики лепры	Чувствительность для многобактериальных форм, n=22		Чувствительность для малобактериальных форм, n=10		Специфичность, n=25	
	Положительная реакция	Отрицательная реакция	Положительная реакция	Отрицательная реакция	Положительная реакция	Отрицательная реакция
№1 (ФГЛ-1-БСА)	21 (95,4%)	1 (4,6%)	6 (60%)	4 (40%)	-	25 (100%)
№2 (ФГЛ-1/ЛАМ-БСА)	21 (95,4%)	1 (4,6%)	8 (80%)	2 (20%)	-	25 (100%)
№3 (ЛАМ-БСА)	21 (95,4%)	1 (4,6%)	5 (50%)	5 (50%)	-	25 (100%)

жительный результат, свидетельствующий о чувствительности ИХ-тестов в отношении МВ формы заболевания на уровне 95,4% (см. таблицу).

При проведении анализа сывороток крови больных с малобактериальной формой лепры ( $n=10$ ) установлен различный уровень чувствительности сконструированных ИХ-тестов. Так, ИХ-тест на основе конъюгата БСА с дисахаридной детерминантой ФГЛ-1 (ФГЛ-1-БСА) показал положительный результат с 6 образцами сывороток крови больных с РВ формой лепры, с 4 образцами сывороток крови больных из данной группы зарегистрирован ложноотрицательный результат. ИХ-тест на основе конъюгата БСА с синтетизированным комплексом дисахаридной детерминанты ФГЛ-1 и гексасахаридной детерминанты ЛАМ (ФГЛ-1/ЛАМ-БСА) позволил выявить 8 сывороток крови больных с РВ формой лепры при 2 ложноотрицательных результатах (чувствительность анализа составила 80%). При проведении анализа данной группы сывороток крови с использованием ИХ-теста сконструированного с использованием конъюгата БСА с диарабинофуранозным фрагментом ЛАМ (ЛАМ-БСА) положительный результат отмечен с 5 образцами сывороток крови, с 5 образцами сывороток крови – ложноотрицательный результат (чувствительность анализа составила 50%).

Иммунохроматографический анализ сывороток крови здоровых доноров ( $n=20$ ) с вновь разработанными ИХ-тестами на основе трёх синтетических гликоконъюгатов показал отрицательный результат. Также зарегистрирован отрицательный результат при проведении анализа с сыворотками крови контактных по лепре лиц ( $n=5$ ). Ложноположительных результатов анализа не выявлено. Таким образом, специфичность анализа с ИХ-тестами на основе всех использованных при конструировании конъюгатов составила 100%. Воспроизводимость анализа во всех случаях составила 100%.

Высокая чувствительность (95,4%) разработанных ИХ-тестов на основе трех синтетических гликоконъюгатов в отношении МВ формы заболевания связана с тем, что использованные фрагменты принадлежат к основным диагностически значимым микобактериальным антигенам. При анализе результатов исследования с сыворотками крови больных с РВ формой лепры, показано, что из трёх конъюгатов, в качестве биокомпонента ИХ-теста наиболее пригоден конъюгат БСА с синтетическим антигенным комплексом дисахаридного фрагмента ФГЛ-1 и разветвлённого гексасахаридного фрагмента ЛАМ (ФГЛ-1/ЛАМ-БСА). Наличие специфических антител к *M. leprae* с помощью сконструированного ИХ-теста установлено в 80% сывороток крови больных с РВ формой лепры. Данная чувствительность иммунохроматографического анализа обусловлена наличием в составе конъюгата комплекса фрагментов основных видо- и родоспецифичных микобактериальных антигенных эпитопов, на которые и происходит выработка антител в процессе заболевания лепрой. Сконструированные с использованием синтетических микобактериаль-

ных гликоконъюгатов ИХ-тесты высокоспецифичны в отношении сывороток крови здоровых доноров и контактных по лепре лиц.

Полученные в ходе работы данные позволяют сделать вывод о возможности использования синтетического гликоконъюгата на основе дисахаридного фрагмента ФГЛ-1 и разветвлённого гексасахаридного фрагмента ЛАМ в качестве компонента иммунохроматографических тестов для серодиагностики лепры.

Перспективность подхода по использованию конъюгатов (ФГЛ-1/ЛАМ-БСА) углеводных эпитопов микобактериальных антигенов в разработке серотестов на основе иммунохроматографии требует дальнейшего исследования с использованием представителем набора сывороток больных различными формами лепры и лиц контактных по лепре.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках НИР 056 и диссертационной работы.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 13-16 см. REFERENCES)

- Образцова О.А. Молекулярно-биологические методы исследования в лабораторной диагностике лепры: эпидемиологический анализ, генетические детерминанты резистентности к антимикробным препаратам. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2017; (6): 34–40.
- Кондаков Н.Н., Мельникова Т.М., Чекрыжова Т.В., Мельникова М.В., Зинин А.И., Торгов В.И., Чижов А.О., Кононов Л.О. Синтез дисахарида фенольного гликолипида *Mycobacterium leprae* (PGL-1) и его конъюгатов с бычьим сывороточным альбумином. *Известия Академии наук. Серия химическая*. 2015; 64(5): 1142–8.
- Горбатов А.А., Соловьёв П.В., Баранова Е.В., Титарева Г.М., Куликалова Е.С., Бикетов С.Ф., Мазепа А.В. Сравнительное исследование экспериментальных и коммерческих серологических тестов для определения противотуберкулезных антител у людей. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63(10): 630–5.
- Федюкина Г.Н., Ветчинин С.С., Баранова Е.В., Рудницкий С.Ю., Соловьёв П.В., Колосова Н.В., Бикетов С.Ф. Получение компонентов иммунохроматографического теста для выявления возбудителей сапа и мелииоза. *Биотехнология*. 2015; 1: 85 – 92.
- Корольева-Ушакова А.Г., Баранова Е.В., Игнатов С.Г., Соловьёв П.В., Кондаков Н.Н., Мельникова Т.М., Абронина П.И., Подвальный Н.М., Кононов Л.О., Бикетов С.Ф. Сравнительная характеристика диагностического потенциала микобактериальных синтетических антигенов для серодиагностики лепры и туберкулеза. *Прикладная биохимия и микробиология*. 2019; 55(6): 608–16.

## REFERENCES

- WHO режим доступа [http://www.who.int/neglected\\_diseases/news/WHO-to-publish-first-guidelines-on-leprosy-diagnosis/en/Guidelines for the Diagnosis, Treatment and Prevention of Leprosy](http://www.who.int/neglected_diseases/news/WHO-to-publish-first-guidelines-on-leprosy-diagnosis/en/Guidelines%20for%20the%20Diagnosis,%20Treatment%20and%20Prevention%20of%20Leprosy). Geneva. 28 June 2018.
- Obraztsova O.A. Molecular-biological Methods of Research in Laboratory Diagnostics of Leprosy: Epidemiological Analysis, Genetic Determinants of Resistance to Antimicrobial Drugs. *Vestnik Dermatologii i Venerologii*. 2017; 6: 34–40. (in Russian)
- Spencer J.S., Kim H.J., Wheat W.H., Chatterjee D., Balagon M.V., Cellona R.V. et al. Analysis of Antibody Responses to *Mycobacterium leprae* Phenolic Glycolipid I, Lipoarabinomannan, and Recombinant Proteins To Define Disease Subtype-Specific Antigenic Profiles in Leprosy. *Clinical and vaccine immunology*. 2011; 18(2): 260–7.

4. Abronina P.I., Podvalnyy N. M., Fedina K.G., Kondakov N.N., Zinin A.I., Chizhov A.O., Torgov V.I., Kachala V.V., Kononov L.O.. Synthesis of hexasaccharide fragment of lipoarabomannan from Mycobacteria: advantages of the benzylfree approach. *Russian Chemical Bulletin, International Edition*. 2015; 5: 1149–62.
5. Kondakov N.N., Mel'nikova T.M., Mel'nikova M.V. Chekrizhova T.V., Zinin A.I., Chizhov A.O., Torgov V.I., Kononov L.O. Synthesis of the disaccharide phenolic glycolipid Mycobacterium leprae (PGL-I) and its conjugates with bovine serum albumin. *Izvestiya Akademii nauk. Seriya khimicheskaya*. 2015; 64 (5): 1142-8. (in Russian)
6. Espinosa Omar Ariel, Ferreira S.M.B., Palacio F.G.L., Cortela Denise da Costa Boamorte, Ignotti E. Accuracy of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISAs) in Detecting Antibodies against Mycobacterium leprae in Leprosy Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*. 2018; Article ID 9828023, 11 pages. <https://doi.org/10.1155/2018/9828023>.
7. Penna M.L., Penna G.O., Iglesias P.C., Natal S., Rodrigues. Anti – PGL-I positivity as a risk marker for the development of leprosy among contacts of leprosy cases:systematic review and meta – analysis. *PLoS Neglected Tropical diseases*. 2016; 10(5): e004703, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004703>.
8. Gorbatov A.A., Soloviev P.V., Baranova E.V., Titareva G.M., Kulikalova E.S., Mazepa A.V., Biketov S.F. A comparative study of experimental and commercial serological tests for detection of antibodies in humans with tularemia. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2018; 63(10): 630-5. (in Russian)
9. Fedukina G.N., Vetchinin S.S., Baranova E.V., Rudnitskii S.U., Soloviev P.V., Kolosova N.V., Biketov S.F. Obtaining components of immunochromatographic test to identify the causative agents of glanders and melioidosis. *Biotechnologiya*. 2015; 1: 85 – 92. (in Russian)
10. Duthie M.S., Goto W., Ireton G.C., Reece S.T., Cardoso L.P.V., Martelli C.M.T., Stefani M.M.A., Nakatani M., de Jesus R.C., Netto E.M., Balagon M.V.F., Tan E., Gelber R.H., Maeda Y., Makino M., Hoft D., Reed S.G. Use of protein antigens for early serological diagnosis of leprosy. *Clin. Vacc. Immunol*. 2007; 14: 1400-8.
11. Geluk A. Challenges in immunodiagnostic tests for leprosy. *Expert Opinion Med.diagn*. 2013; 7(3): 265-74.
12. Korolyova-Ushakova A.G., Baranova E.V., Ignatov S.G., Soloviev P.V., Kondakov N.N., Mel'nikova T.M., Abronina P.I., Podval'niy N.M., Kononov L.O., Biketov S.F. Comparative characteristics of the diagnostic potential of mycobacterial synthetic antigens for serodiagnostics of leprosy and tuberculosis. *Prikladnaya biokhimiya I mikrobiologiya*. 2019; 55(6): 608-16. (in Russian)
13. Turkevich J., Stevenson P. C., Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*. 1951; 11- 5.
14. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature*. 1973; 241(105): 20-2.
15. Haiss W., Nguyen T. K., Aveyard T.J., Fernig D.J. Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra. *Anal. Chem*. 2007; 79: 4215-21.
16. Hermanson G.T. Bioconjugate Techniques. *Academic Press*. 1996; 813.

Поступила 28.01.20  
Принята к печати 14.02.20