



ДИАГНОСТИКА ОБРАЗЦОВ ВАСТЕС ИММУНОГЛОБУЛИНАМИ ГИПЕРИММУННЫХ СЫВОРОТОК МЫШЕЙ, ПОЛУЧЕННЫХ ПРОТИВ МОДИФИЦИРОВАННЫХ АНТИГЕНОВ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS**

И. В. КОЗЛОВА, В. Г. АВДИЕНКО, С. С. БАБАЯН, И. Ю. АНДРИЕВСКАЯ, В. Я. ГЕРГЕРТ

ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, РФ

Цель исследования: методом двусайтового иммуноферментного анализа (ИФА) оценить специфичность антигенов дигестивно- и химически модифицированной клеточной стенки (КС) *M. tuberculosis*.

Материалы и методы. Против модифицированных антигенов КС получены гипериммунные сыворотки мышей, из них выделены иммуноглобулины разных подклассов. С их помощью в ИФА исследовано 152 культуры Bactec с микобактериальным и немикобактериальным ростом от больных с заболеваниями легких.

Результаты. При обработке КС протеиназой К (рК) содержание белка снижается в 10 раз, при гидролизе NaOH – более чем в 30 раз. В иммуноблоттинге отмечается сужение спектра распознаваемых антигенов сыворотками гипериммунных мышей (по сравнению с цельными КС), что свидетельствует о снижении их иммуногенности. Модификация КС *M. tuberculosis* дезавуирует антиген 54 кДа, на который развивается сильный ответ IgG1-подкласса.

Диагностическая эффективность в ИФА с культурами Bactec возрастает при использовании иммуноглобулинов, полученных против антигенов, обработанных протеиназой К – 79,14% (Pr.A) и 86,68% (Pr.G), при сравнении с иммуноглобулинами против исходного препарата – 70,69% (Pr.A) и 69,11% (Pr.G). Специфичность значительно возрастает при использовании IgG1-антител после иммунизации КС обработанными рК (71,92% против 25,93% в исходном препарате). Таким образом, идентифицированы новые антигены *M. tuberculosis*, против них созданы новые антительные препараты для диагностики в микробиологических культурах.

Ключевые слова: моноклональные антитела, *Mycobacterium tuberculosis*, микобактериальные антигены, двусайтовый ИФА, иммуноблоттинг

Для цитирования: Козлова И. В., Авдиенко В. Г., Бабаян С. С., Андриевская И. Ю., Гергерт В. Я. Диагностика образцов Bactec иммуноглобулинами гипериммунных сывороток мышей, полученных против модифицированных антигенов клеточной стенки *Mycobacterium tuberculosis* // Туберкулез и болезни лёгких. – 2019. – Т. 97, № 10. – С. 25-30. <http://doi.org/10.21292/2075-1230-2019-97-10-25-30>

DIAGNOSIS OF BACTEC SAMPLES BY IMMUNOGLOBULINS OF MOUSE HYPERIMMUNE SERA OBTAINED AGAINST MODIFIED ANTIGENS OF THE CELL WALL OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

I. V. KOZLOVA, V. G. AVDIENKO, S. S. BABAYAN, I. YU. ANDRIEVSKAYA, V. YA. GERGERT

Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russia

The objective: using double-site enzyme immunoassay (ELISA) to evaluate the specificity of the antigens of digestive and chemically modified cell walls (CW) of *M. tuberculosis*.

Subjects and methods. Hyperimmune sera of mice were obtained against modified CW antigens; immunoglobulins of different subclasses were isolated from them. With their help, 152 Bactec cultures with mycobacterial and non-mycobacterial growth from patients with lung diseases were tested by ELISA.

Results. When CW was treated with proteinase K (prK), the protein content decreased by 10 times, and upon hydrolysis of NaOH, by more than 30 times. In immunoblotting, there was a narrowing of the spectrum of recognized antigens by the sera of hyperimmune mice (compared with whole CW), which indicated a decrease in their immunogenicity. Modification of WC of *M. tuberculosis* disavows 54 kDa antigen, causing a strong IgG1 subclass response.

Diagnostic efficacy in ELISA with Bactec cultures increases with the use of immunoglobulins obtained against antigens treated with proteinase K – 79.14% (Pr.A) and 86.68% (Pr.G), when compared with immunoglobulins against the original drug – 70.69% (Pr.A) and 69.11% (Pr.G). Specificity increases significantly when using IgG1 antibodies after immunization with CW treated with prK (71.92% versus 25.93% in the initial preparation). Thus, new antigens of *M. tuberculosis* were identified, new antibody preparations for diagnosis in microbiological cultures were created against them.

Key words: monoclonal antibodies, *Mycobacterium tuberculosis*, mycobacterial antigens, two-site ELISA, immunoblotting

For citations: Kozlova I.V., Avdienko V.G., Babayan S.S., Andrievskaya I.Yu., Gergert V.Ya. Diagnosis of Bactec samples by immunoglobulins of mouse hyperimmune sera obtained against modified antigens of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis and Lung Diseases*, 2019, Vol. 97, no. 10, P. 25-30. (In Russ.) <http://doi.org/10.21292/2075-1230-2019-97-10-25-30>

Микобактерии не относят ни к грамположительным, ни к грамотрицательным бактериям из-за плохого окрашивания по Грамму. Это объясняется

сложным строением клеточной оболочки и высоким содержанием липидов, что обеспечивает микобактериям устойчивость ко многим антибиотикам и

* Работа выполнена в рамках темы НИР № 0515-2019-0018 «Изучение механизмов врожденного и адаптивного звеньев иммунного ответа при туберкулезе и интерстициальных заболеваниях легких».

способность выживать в экстремальных условиях организма человека (кислотность или щелочность, низкое содержание кислорода) [2].

Микобактерии туберкулеза, в отличие от неvirulentных микобактерий, обладают изощренной системой защиты, локализованной в клеточной стенке (КС). Сложная система пор ESX-1 – ESX-5 обеспечивает избирательную проницаемость клеточной оболочки микобактерии, а поступление питательных веществ через оболочку внутрь клетки – энергозависимый процесс, связанный с рецепторным аппаратом. Эта сложная система пор также отвечает за секрецию факторов вирулентности, защиту *Mycobacterium tuberculosis* от переваривания в фагосоме и от ответа иммунной системы хозяина [6]. Система секреции ESX-5 обнаружена только в медленно растущих микобактериях, представители которых наиболее патогенны. Через эту систему пор секретируются два класса эффекторных белков, богатых Pro-Glu (PE) или Pro-Pro-Glu (PPE), некоторые из которых необходимы для иммунной инвазии [3]. Система токсин – антитоксин, состоящая не менее чем из 200 компонентов, позволяет выживать во внешней среде в борьбе с другими бактериями [8].

КС *M. tuberculosis* принципиально не отличается по строению от микобактерий всего семейства *Mycobacteriaceae* и даже сходна с КС всего рода *Actinomycetaceae*, куда входят нокардии, коринобактерии [11]. В ее состав входит традиционная бислойная фосфолипидная мембрана с интегрированными белками. Далее идет периплазматическое пространство, которое отделяет плазматическую мембрану от так называемой микомембраны, толщина которой всего 7-8 нм. Она представляет собой нетрадиционную бислойную мембрану и состоит из миколовых кислот (жирные кислоты с длинными цепями C₇₀-C₉₀), этерифицированных арабиногалактаном, который ковалентно прикреплен к пептидогликану. Вместе они образуют комплекс миколил-арабиногалактан-пептидогликан (mAGP), который необходим микобактерии для выживания и который отвечает за чувствительность/устойчивость ко многим противотуберкулезным препаратам. Именно за счет этой особенности строения КС содержание липидов в микобактериях доходит до 40% от сухой массы (в КС содержится 60% липидов, в сравнении с 20% у грамотрицательных бактерий). Внешний слой микомембраны (капсула) сильно неоднороден и скомпонован из липидов, экстрагируемых органическими растворителями (фосфолипидов, трегалозомиколоатов, гликопептидолипидов и липогликанов), и белков [5].

В геноме *Mycobacterium tuberculosis* содержится порядка 2 тыс. генов белков. В оболочке микобактерии находятся более 200 белков: белки, выполняющие синтез клеточной оболочки, участвующие в мембранном транспорте, отвечающие за стрессовые ситуации (белки теплового шока), регуляторные белки, взаимодействующие с клетками хозяина, от-

вечающие за антимикробную устойчивость (токсин – антитоксин), белки-мишени лекарственных препаратов. Важную роль в жизнедеятельности микобактерий играют посттрансляционные модификации (PTMs), такие как гликозилирование и ацилирование белков. Уникальные гликоконъюгаты клеточной оболочки *M. tuberculosis* являются основными молекулами, отвечающими за антигенность, патогенность и вирулентность, взаимодействие микобактерий с клетками хозяина, антимикробную устойчивость. Гликопротеины микобактерий играют решающую роль во многих процессах, таких как клеточная адгезия и инвазия, стабилизация и локализация белков, поддержание конформации белков, формирование белковых комплексов, клеточная сигнализация, иммуномодуляция, внутриклеточное выживание микобактерий, образование биопленок. Также известно, что процесс гликозилирования белков приводит к низкой проницаемости клеточной оболочки микобактерий [4].

КС столь прочна, что воздействие протеаз и химическое воздействие слабых растворов кислот и щелочей чаще всего не сказывается на жизнедеятельности *M. tuberculosis*. При этом следует учесть, что иммунный ответ идет в основном на белковые антигены. Поэтому представляется интересным исследование протеазоустойчивых антигенов и иммунного ответа на них.

Цель исследования: оценить специфичность антигенов дигестивно- и химически модифицированной КС *M. tuberculosis*.

Материалы и методы

Для достижения цели было необходимо: получить гипериммунные сыворотки мышей и выделить иммуноглобулины разных подклассов в иммуноаффинной хроматографии; исследовать спектры антигенов, распознаваемых очищенными иммуноглобулинами в иммуноблоттинге; на основе очищенных иммуноглобулинов создать тесты двусайтового иммуноферментного анализа и оценить специфичность модифицированных антигенов КС *M. tuberculosis*.

Культуры микобактерий. Исследовано 152 культуры с микобактериальным и немикобактериальным ростом, полученные от больных с заболеваниями легких, проходивших лечение в ФГБНУ «ЦНИИТ». Диагностический материал был культивирован в системе автоматической регистрации роста Вастес MGIT 960 (BD, США) согласно руководству производителя [9] и получен в виде жидких MGIT-образцов. Положительные пробы после окрашивания по Цилю – Нильсену микроскопировали для выявления кислотоустойчивых микобактерий. ДНК положительных образцов выделяли набором реагентов «М-Сорб-Туб-Автомат» и подтверждали наличие возбудителя путем полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени с помощью набора «АмплиТуб-РВ» (Синтол, Россия).

В экспериментах применяли лабораторный штамм *M. tuberculosis* H37Rv, а также нетуберкулезные микобактерии из коллекции ФГБНУ «ЦНИИ туберкулеза».

Выявление нетуберкулезных микобактерий проводили методом ДНК-стрипов, наборами реагентов GenoType® Mycobacterium CM/AS (Hain Lifescience, Германия) согласно инструкции производителя.

Ультразвуковые дезинтеграторы (УЗД) были приготовлены из отмытой бактериальной массы на ультразвуковом дезинтеграторе MSE при 300 Вт в течение 30 мин при интенсивном охлаждении. Содержание белка определяли методом Брэдфорда.

Модифицированные препараты КС получали многократной отмывкой осадка УЗД *M. tuberculosis* H37Rv в забуференном фосфатами физрастворе (PBS) с последующей обработкой протеиназой К (КС-рК), или 5N NaOH (КС-NaOH) в течение ночи при 37°C, или не обрабатывали (КС-PBS). Осадки 3-кратно отмывали в PBS, ресуспендировали и в суспензиях определяли концентрацию белка.

Поликлональные сыворотки мышей. Мышей линии BALB/c, выращенных в виварии ФГБНУ «ЦНИИТ», иммунизировали препаратами КС *M. tuberculosis* H37Rv (КС-PBS, КС-рК и КС-NaOH) по схеме 0, 14, 28-й день в неполном адьюванте Фрейнда в количестве 50 мкг на животное. На 42-й день иммунизации у мышей собирали кровь из орбитального венозного синуса и выделяли сыворотки.

Иммуносорбентная аффинная хроматография. Для очистки поликлональных антител из сывороток мышей применяли иммуноаффинную хроматографию на сефарозе, ковалентно связанной с белками А (р.А) и G (р.Г) в FPLC (Pharmacia, Швеция). Эфлюаты на р.А и р.Г диализовали против PBS, концентрировали ультрафильтрацией.

Иммуноблоттинг (Western blotting). Иммуноблоттинг проводили согласно стандартной методике Western blot на расфракционированном в редуцирующих условиях в диск-электрофорезе в 12,5% ПААГ КС-PBS.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Связывание антител против модифицированных антигенов с антигенами из проб Вастес оценивали в *двусайтовом иммуноферментном анализе*. Для этого очищенные на р.А и р.Г антитела наносили на поверхность планшетов для ИФА (в качестве сартуре «захвата» для антигена) в концентрации 5 мкг/мл, инкубировали в течение ночи при 4°C, отмывали PBS, содержащим 0,001% Tween 20 (PBST), далее добавляли разведенные в 2 раза PBST образцы MGIT, а также титровали УЗД *M. tuberculosis* H37Rv в качестве стандарта. Далее инкубировали, отмывали и добавляли аффинно выделенные кроличьи антитела против цельных клеток *M. tuberculosis* H37Rv, полученные прежде [1]. После инкубации и отмывки в лунки вносили иммунопероксидазный конъюгат против иммуноглобулинов кролика. Затем инкуби-

ровали, отмывали и проявляли реакцию, добавляя в качестве субстрата цветной реакции тетраметилбензидин. Планшеты спектрофотометрировали при 450 нм, данные представляли в виде концентраций, рассчитанных по стандартам на каждом планшете.

Статистический анализ. Статистическую обработку проводили в пакете статистического анализа Microsoft Excel стандартными методами оценки вариационных показателей. Диагностическую эффективность рассчитывали согласно формулам и определениям, приведенным R. D. Smith [10]. **Эффективность** – процент положительных реакций с образцами, содержащими туберкулезные микобактерии при концентрации, которой соответствовал равный процент отрицательных реакций с образцами, содержащими нетуберкулезные микобактерии. **Чувствительность** – процент образцов с туберкулезными микобактериями, у которых тест положительный. **Специфичность** – процент образцов с нетуберкулезными микобактериями, у которых тест отрицателен.

Результаты исследования

Из 152 культур, выделенных в жидкой питательной среде Мидлбрук 7Н9 в автоматической системе Вастес MGIT 960, в 66 образцах выявлены кислотоустойчивые бактерии, а методом ПЦР в режиме реального времени подтверждено наличие ДНК *M. tuberculosis* complex, в 38 образцах методом ДНК-стрипов подтвержден рост нетуберкулезных микобактерий, в 48 образцах найдена неспецифическая микрофлора.

В полученных препаратах модифицированных КС содержание белка составляло: в исходном препарате КС-PBS 2,495 мг/мл, в КС-рК 247 мкг/мл, в КС-NaOH 76 мкг/мл. После многократной иммунизации от 3-4 мышей линии BALB/c препаратами КС собирали кровь и получали сыворотки. Их пулировали и использовали для выделения иммуноглобулинов в аффинной хроматографии. На колонке с Sepharose CL4B, ковалентно связанной с белком G, преимущественно выделяли IgG1-подклассы, а на сорбенте с белком А – IgG2a- и IgG2b-подклассы. Полученные препараты очищенных иммуноглобулинов концентрировали ультрафильтрацией и диализовали против PBS. Спектры антигенов, распознаваемых иммуноглобулинами из гипериммунных сывороток мышей, исследовали в иммуноблоттинге (рис. 1).

КС-NaOH реагировали не менее чем с 10 антигенами молекулярной массы в диапазоне 25-200 кДа, КС-рК связывались не менее чем с 19 антигенами в диапазоне 13-200 кДа, исходный препарат иммуноглобулинов КС-PBS распознавал более 20 антигенов в области 10-200 кДа.

После денситометрирования иммуноблоттингов строили графики зависимости интенсивности реакции от молекулярной массы (рис. 2). Различия

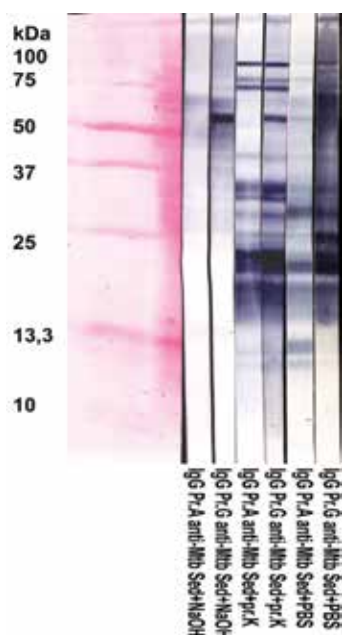


Рис. 1. Иммуноблоттинг аффинно выделенных иммуноглобулинов гипериммунных сывороток мышей, иммунизированных исходным и модифицированными препаратами клеточных стенок *M. tuberculosis* с антигенами КС *M. tuberculosis* H37Rv

Fig. 1. Immunoblotting of affinity-isolated immunoglobulins of hyperimmune sera of mice immunized with the initial and modified preparations of *M. tuberculosis* cell walls with *M. tuberculosis* H37Rv CS antigens

между спектрами распознавания препаратами иммуноглобулинов, выделенными на сорбентах с белком А и G, были незначительны и заключались в наличии дополнительного связывания prG-КС-NaOH и prG-КС-prK с антигеном 54 кДа.

Все образцы культурального материала Вастес протестированы в двусайтовом ИФА с иммуноглобулинами против модифицированных антигенов КС, полученные диагностические данные сведены в таблицу.

Заключение

Обработка клеточных оболочек *M. tuberculosis* приводит к заметному уменьшению содержания

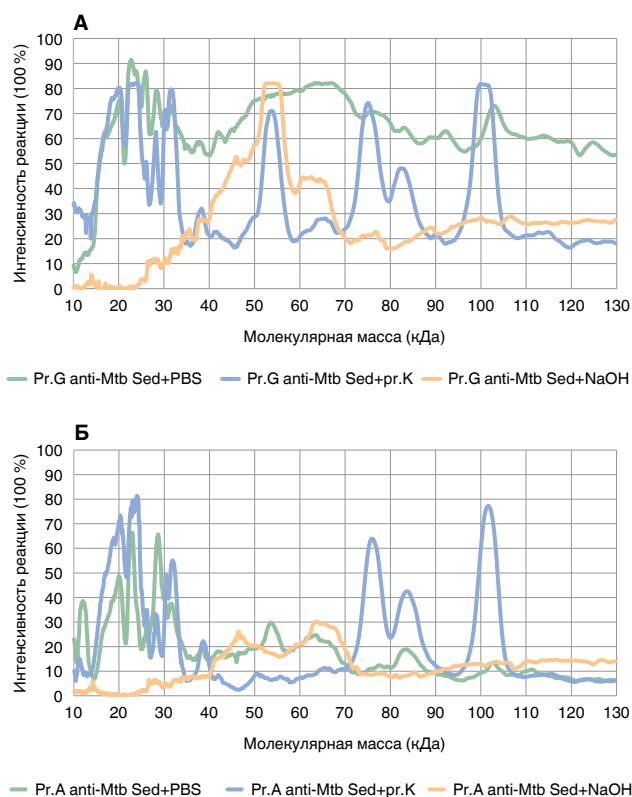


Рис. 2. Денситометрия иммуноблоттинга иммуноглобулинов сывороток BALB/c адсорбированных на белке G (А) и белке А (Б)

Fig. 2. Densitometry of immunoblotting of immunoglobulins of BALB/c sera adsorbed on protein G (A) and protein A (B)

белка: в 10 раз при обработке протеиназой К и более чем в 30 раз при жестком гидролизе NaOH, тем самым оказывая сильное воздействие на белковые антигены, содержание которых в КС может составлять от 40 до 70% от сухой массы микобактерии в зависимости от фазы роста [7]. Эти изменения в иммуногенности модифицированных препаратов становятся заметны при исследовании антител сывороток иммунных животных. Происходит сужение спектра распознаваемых антигенов иммунными сыворотками мышей: более 20 распознаваемых антигенов в исходном антигене, 19 после действия проте-

Таблица. Диагностические исследования образцов Bactec MGIT 960 в двусайтовом ИФА на аффинно выделенных иммуноглобулинах мышей

Table. Diagnostic testing of Bactec MGIT 960 samples in a two-site ELISA of mouse affinity immunoglobulins

Диагностический показатель	prA-КС-PBS	prG-КС-PBS	prA-КС-prK	prG-КС-prK	prA-КС-NaOH	prG-КС-NaOH
Истинное превазирование	0,374	0,374	0,434	0,434	0,434	0,434
Предсказательная оценка положительного теста	0,750	0,719	0,867	0,905	0,810	0,850
Предсказательная оценка отрицательного теста	0,492	0,492	0,522	0,528	0,511	0,522
Точка раздела, мг/мл	4,16	4,12	0,03	1,96	0,00	0,64
Эффективность, %	70,69	69,11	79,14	86,68	72,26	77,05
Специфичность, %	32,94	25,93	44,08	71,92	31,28	21,96
Чувствительность, %	97,74	96,97	97,45	95,90	83,91	97,78

иназы К и менее 10 после гидролиза NaOH. То есть уменьшение содержания белка в КС микобактерии приводит к снижению ее иммуногенности. Кроме того, модификация КС *M. tuberculosis* дезавуирует антиген 54 кДа, на который развивается сильный ответ IgG1 подкласса у гипериммунных животных.

Диагностическая эффективность исследования МГИТ-образцов Вастес на аффинно выделенных иммуноглобулинах заметно повышается при использовании иммуноглобулинов, выделенных из сывороток мышей, иммунизированных КС, обработанными протеиназой К [70,69% (Pr.A) и 69,11% (Pr.G) против 79,14% (Pr.A) и 86,68% (Pr.G)].

Специфичность диагностики значительно возрастает при использовании IgG1-антител после гипериммунизации КС, обработанными протеиназой К (71,92% против 25,93% в исходном препарате КС).

Таким образом, исследование антигенов, остающихся в КС микобактерии после переваривания протеазами и жесткой обработки щелочью дает не только новые знания о строении КС микобактерии, но и позволяет получить иммунологические инструменты (антитела), с помощью которых можно идентифицировать новые антигены *M. tuberculosis* и создавать новые препараты для их диагностики в биологических жидкостях больных туберкулезом.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.

Conflict of Interests. The authors state that they have no conflict of interests.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авдиенко В. Г., Бабаян С. С., Козлова И. В., Бочарова И. В. Оценка специфичности противотуберкулезных моноклональных антител в двусайтовом иммуноферментном анализе // Международный научно-исследовательский журнал. – 2018. – № 2 (67), ч. 2. – С. 21-24.
2. Adigun R., Singh R. Tuberculosis // *Treasure Island (FL): StatPearls Publ.* – 2019.
3. Beckham K., Ciccarelli L., Bunduc C. M. et al. Structure of the mycobacterial ESX-5 type VII secretion system membrane complex by single-particle analysis // *Nat. Microbiol.* – 2017. – № 2:17047. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2017.47.
4. Birhanu A. G., Yimer S. A., Kalayou S. et al. Ample glycosylation in membrane and cell envelope proteins may explain the phenotypic diversity and virulence in the Mycobacterium tuberculosis complex // *Sci. Rep.* – 2019. – № 9 (1): 2927. DOI: 10.1038/s41598-019-39654-9.
5. Chiaradia L., Lefebvre C., Parra J., Marcoux J. et al. Dissecting the mycobacterial cell envelope and defining the composition of the native mycomembrane // *Sci. Rep.* – 2017. – № 7 (1): 12807. DOI: 10.1038/s41598-017-12718-4.
6. Gröschel M. I., Sayes F., Simeone R. et al. ESX secretion systems: mycobacterial evolution to counter host immunity // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2016. – № 14 (11). – P. 677-691. DOI: 10.1038/nrmicro.2016.131.
7. Ortalo-Magné A., Dupont M. A., Lemassu A. Molecular composition of the outermost capsular material of the tubercle bacillus // *Microbiol.* – 1995. – № 141. – P. 1609-1620.
8. Sharrock A., Ruthe A., Andrews E. S. V. et al. VapC proteins from Mycobacterium tuberculosis share ribonuclease sequence specificity but differ in regulation and toxicity // *PLoS ONE*. – 2018. – № 13 (8): e0203412. DOI: 10.1371/journal.pone.0203412.
9. Siddiqi S. H., Rusch-Gerdes S. MGIT Procedure Manual for BACTEC MGIT 960 TB System. – 2006. – P. 89.
10. Smith R. D. Evaluation of diagnostic tests, and Use diagnostic tests in veterinary clinical epidemiology: a problem-oriented approach // 2-Ed. eds. *Batterworth-Heinemann, Boston, USA.* – 1995. – P. 31-70.
11. Vincent A. T., Nyongesa S., Morneau I. et al. The Mycobacterial cell envelope: a relict from the past or the result of recent evolution? // *Front. Microbiol.* – 2018. – № 9: 2341. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02341.

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

ФГБНУ «Центральный НИИ туберкулеза»,
107564, Москва, ул. Яузская аллея, д. 2.

REFERENCES

1. Avdienko V.G., Babayan S.S., Kozlova I.V., Bocharova I.V. Assessing specificity of anti-tuberculosis monoclonal antibodies in two-site ELISA. *Mezhdunarodniy Nauchno-Issledovatel'skiy Zhurnal*, 2018, no. 2 (67), part 2, pp. 21-24. (In Russ.)
2. Adigun R., Singh R. Tuberculosis. *Treasure Island (FL): StatPearls Publ.* 2019.
3. Beckham K., Ciccarelli L., Bunduc C.M. et al. Structure of the mycobacterial ESX-5 type VII secretion system membrane complex by single-particle analysis. *Nat. Microbiol.*, 2017, no. 2:17047. doi: 10.1038/nmicrobiol.2017.47.
4. Birhanu A.G., Yimer S.A., Kalayou S. et al. Ample glycosylation in membrane and cell envelope proteins may explain the phenotypic diversity and virulence in the Mycobacterium tuberculosis complex. *Sci. Rep.*, 2019, no. 9 (1), 2927, doi: 10.1038/s41598-019-39654-9.
5. Chiaradia L., Lefebvre C., Parra J., Marcoux J. et al. Dissecting the mycobacterial cell envelope and defining the composition of the native mycomembrane. *Sci. Rep.*, 2017, no. 7 (1), 12807, doi: 10.1038/s41598-017-12718-4.
6. Gröschel M.I., Sayes F., Simeone R. et al. ESX secretion systems: mycobacterial evolution to counter host immunity. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2016, no. 14 (11), pp. 677-691. doi: 10.1038/nrmicro.2016.131.
7. Ortalo-Magné A., Dupont M.A., Lemassu A. Molecular composition of the outermost capsular material of the tubercle bacillus. *Microbiol.*, 1995, no. 141, pp. 1609-1620.
8. Sharrock A., Ruthe A., Andrews E.S.V. et al. VapC proteins from Mycobacterium tuberculosis share ribonuclease sequence specificity but differ in regulation and toxicity. *PLoS ONE*, 2018, no. 13 (8): e0203412, doi: 10.1371/journal.pone.0203412.
9. Siddiqi S.H., Rusch-Gerdes S. MGIT Procedure Manual for BACTEC MGIT 960 TB System. 2006, pp. 89.
10. Smith R.D. Evaluation of diagnostic tests, and Use diagnostic tests in veterinary clinical epidemiology: a problem-oriented approach. 2-Ed. eds. *Batterworth-Heinemann, Boston, USA.* 1995, pp. 31-70.
11. Vincent A.T., Nyongesa S., Morneau I. et al. The Mycobacterial cell envelope: a relict from the past or the result of recent evolution? *Front. Microbiol.*, 2018, no. 9, 2341, doi: 10.3389/fmicb.2018.02341.

FOR CORRESPONDENCE:

Central Tuberculosis Research Institute,
2, Yauzskaya Alleya, Moscow, 107564.

Козлова Ирина Вячеславовна

младший научный сотрудник отдела иммунологии.
Тел.: 8 (499) 780-49-97.
E-mail: ikozlova_work@inbox.ru

Авдиенко Вадим Григорьевич

кандидат медицинских наук,
старший научный сотрудник отдела иммунологии.
Тел.: 8 (499) 780-49-97.
E-mail: vg_avdienko@mail.ru

Бабаян Сурен Суренович

кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник отдела иммунологии.
Тел.: 8 (499) 780-49-97.
E-mail: suren.babayan@mail.ru

Андриевская Ирина Юрьевна

младший научный сотрудник отдела микробиологии.
Тел.: 8 (499) 785-90-91.
E-mail: andrievskaya.iri@mail.ru

Гергерт Владислав Яковлевич

доктор медицинских наук, профессор,
руководитель отдела иммунологии.
Тел.: 8 (499) 785-90-72.
E-mail: hergertv@mail.ru

Irina V. Kozlova

Junior Researcher of Immunology Department.
Phone: +7 (499) 780-49-97.
Email: ikozlova_work@inbox.ru

Vadim G. Avdienko

Candidate of Medical Sciences,
Senior Researcher of Immunology Department.
Phone: +7 (499) 780-49-97.
Email: vg_avdienko@mail.ru

Suren S. Babayan

Candidate of Biological Sciences,
Senior Researcher of Immunology Department.
Phone: +7 (499) 780-49-97.
Email: suren.babayan@mail.ru

Irina Yu. Andrievskaya

Junior Researcher of Immunology Department.
Phone: +7 (499) 785-90-91.
Email: andrievskaya.iri@mail.ru

Vladislav Ya. Gergert

Doctor of Medical Sciences, Professor,
Head of Immunology Department.
Phone: +7 (499) 785-90-72.
Email: hergertv@mail.ru

Поступила 21.03.2019

Submitted as of 21.03.2019