

УДК 616-002.5

Антиген-стимулированная реактивность на продукцию γ -интерферона в цельной крови у больных активным туберкулезом с иммуносупрессией

З.М. Загдын¹, О.А. Макаренко², А.А. Жирков², А.А. Луцкий², Д. Феррара^{4,5,6,7}, Р. Аксельсон-Робертсон⁴, И. Мегелес⁵, Н.А. Скрынник³, В.Н. Шабалин⁸, Х.Н. Джумаева⁸, Л.И. Арчакова^{1,9}, М. Мейер^{4,5,7}, С.В. Сидоренко², Ю.В. Лобзин²

¹ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии

² Научно-исследовательский институт детских инфекций, Санкт-Петербург

³ Противотуберкулезный диспансер № 12, Санкт-Петербург

⁴ Центр трансплантации аллогенных стволовых клеток, Каролинский университетский госпиталь, Стокгольм, Швеция

⁵ Департамент микробиологии, опухолевой и клеточной биологии, Каролинский университет, Стокгольм, Швеция

⁶ Университет Перуджия, Италия

⁷ Отделение терапевтической иммунологии Департамента лабораторной медицины, Каролинский университет, Стокгольм, Швеция

⁸ Зеленохолмская туберкулезная больница, Ленинградская область, Санкт-Петербург

⁹ Санкт-Петербургский государственный университет

Antigen-stimulated reactivity to the γ -interferon production in the whole blood of patients with active tuberculosis and immunosuppression

Z. Zagdyn¹, O. Makarenko², A. Zhirkov², A. Lutckii², G. Ferrara^{4,5,6,7}, R. Axelsson-Robertson⁴, I. Magalhaes⁵, N. Skrynnik³, V. Shabalin⁸, H. Dzumaeva⁸, L. Archakova^{1,9}, M. Maeurer^{4,5,7}, S. Sidorenko², Yu. Lobzin²

¹ Scientific Research Institute of Phthiopolmonology, St. Petersburg

² Scientific Research Institute of Children's Infections, St. Petersburg

³ St. Petersburg Regional Antituberculosis Dispensary № 12

⁴ CAST, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden

⁵ Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

⁶ University of Perugia, Perugia, Italy

⁷ Division Therapeutic Immunology (TIM), LABMED, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

⁸ Leningrad region's Tuberculosis hospital «Zeleniy Holm», St. Petersburg

⁹ St. Petersburg State University

© Коллектив авторов, 2018 г.

Резюме

Одной из основных причин напряженности эпидемиологической ситуации по туберкулезу сегодня является прогрессирующее распространение ВИЧ-инфекции. На фоне иммуносупрессии возникают значительные трудности в своевременном выявлении туберкулеза. Все это вызывает необходимость разработки новых и эффективных методов как диагностики, так и специфической профилактики, включая разработку новых вакцин, создание которых требует знания наиболее иммуногенных антигенов *Mycobacterium tuberculosis*. В данной работе исследовалась продукция γ -интерферона в цельной крови пациентов с активным туберкулезом в ответ на стимуляцию различными белковыми антигенами *Mycobacterium tuberculosis*. Результаты исследования позволили дать оценку иммуногенности ранее изученных белков (Ag85a и ESAT-6) в сравнении с недавно идентифицированными белками (Rv2957, Rv2958c и Rv0447), с одновременным изучением их отношений к туберкулину и антигенам различных вирусов (вирус иммунодефицита человека, цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барр, вирус гриппа). По отношению к туберкулину белок Rv2958c, в отличие от белка ESAT-6, показал большую иммуногенность. Выраженная иммуногенность белка Rv2958c может свидетельствовать о возможно большей специфичности иммунного ответа на этот антиген у больных туберкулезом. Между тем бактериовыделение было ассоциировано с достоверно низким иммунным ответом на данный белок. Также выявлены статистические различия в иммунореактивности пациентов к различным антигенам *Mycobacterium tuberculosis* в зависимости от наличия или отсутствия лекарственной устойчивости возбудителя. Представляет интерес достоверно низкая иммунореактивность пациентов с лекарственно-устойчивым туберкулезом в отношении белка pp65 CMV.

Ключевые слова: туберкулез, ВИЧ-инфекция, продукция γ -интерферона, специфический иммунный ответ, туберкулез и вирусные инфекции

Summary

HIV-infection progressive spread is one of the main causes of the current TB epidemic situation tension. Immunosuppression induces significant difficulties on the timely TB diagnosing. All these call for the necessity to develop of the novel and effective methods for diagnosis as well as for specific prevention, including a developing of the new vaccines, the creation of which requires the knowledge of the most immunogenic antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. We studied the Interferon- γ production in the whole blood after stimulating immune response with different proteins of *Mycobacterium tuberculosis* in patients with active TB. The study results permitted us to evaluate the immunogenicity of the previously known proteins (Ag85a and ESAT-6) in comparison to the recently identified ones (Rv2957, Rv2958c and Rv0447), analyzing simultaneously their relation to tuberculin, as well as to antigens of the different viruses (human immunodeficiency virus, cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, influenza virus). Protein Rv2958c, unlike protein ESAT-6, showed the high immunogenicity regarding to tuberculin. The expressed immunogenicity of protein Rv2958c might be indicated a possible greatest specificity of immune response to this antigen in TB patients. Meanwhile, bacillary tuberculosis was strongly associated with low immune response to this protein. We also were found statistical differences in immune responses of patients to the different *Mycobacterium tuberculosis* antigens depending on the drug sensitivity. In addition it was interesting to know about a significantly low immune response of patients with Drug Resistant TB to protein pp65 CMV.

Keywords: tuberculosis, HIV-infection, γ -interferon production, specific immune response, tuberculosis and virus co-infections

Введение

По данным глобального отчета ВОЗ туберкулез (ТБ) в мире до настоящего времени остается ведущей причиной смерти от инфекционных заболеваний, опережая ВИЧ/СПИД [1]. Основными причинами неблагоприятной ситуации по туберкулезу являются развитие пандемии ВИЧ-инфекции и распространение туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью [2, 3]. Российская Федерация входит в число стран с наибольшим бременем туберкулеза и, как и во многих странах, все большую роль в высоком распространении ТБ и смертности от него продолжает играть рост

заболеваемости туберкулезом среди лиц с ВИЧ-инфекцией [4–6]. Наличие ВИЧ — самый высокий риск развития туберкулеза [7].

Своевременное выявление и диагностика туберкулеза у иммунокомпрометированных лиц (ВИЧ-инфекция, прием иммуноориентированных средств и т.д.) становится трудной в связи с особенностями развития клинических проявлений заболевания, атипичностью рентгенологической картины и олигобациллярностью таких пациентов. Применяемая проба с туберкулином зачастую дает ложноположительные результаты в связи с БЦЖ-вакцинацией на уровне популяции, ложноотрицательные и/или искаженные

результаты у пациентов с тяжелым иммунодефицитом [8]. Относительно новые иммунодиагностические методы, такие как QuantiFERON GOLD in Tubes (Q-GIT), по данным российских исследователей демонстрируют противоречивые результаты, особенно у иммунокомпрометированных лиц [9, 10], из-за высокой инфицированности населения туберкулезом и широкой распространенности специфической профилактики вакциной БЦЖ. До настоящего времени в России рутинно продолжается применение ревакцинации БЦЖ. При этом влияние вакцинации и ревакцинации БЦЖ, в сочетании с последующим инфицированием ТБ, на продукцию интерферона- γ (ИФН) в Q-GIT, который имеет один общий антиген (АГ) с вакциной БЦЖ (ТВ7.7), несмотря на отсутствие у нее двух других антигенов ИФН (CFP10 и ESAT-6), не изучалось. Кроме того, формирование специфического клеточного иммунного ответа на АГ *Mycobacterium tuberculosis* (MT) зависит от множества факторов: течения латентного туберкулеза, который на протяжении всей жизни может оставаться скрытым или же перейти в активную форму, повторного инфицирования MT, особенно лекарственно-устойчивыми (ЛУ) штаммами, инфицирования другими патогенами (ВИЧ, цитомегаловирус — ЦМВ, вирус Эпштейна–Барр — ЭБВ, и др.), сопутствующих неинфекционных заболеваний и других причин. Следовательно, существует необходимость в создании новых, эффективных и доступных в широком масштабе иммунологических методов диагностики и специфической профилактики туберкулеза, разработка которых требует знания наиболее иммуногенных эпитопов антигенов MT [11]. Ранее проведенный скрининг протеинов MT позволил идентифицировать иммуногенные аминокислотные последовательности, которые стали кандидатами для дальнейшего изучения в популяции пациентов с активным легочным туберкулезом, как лекарственно-устойчивым, так и лекарственно-чувствительным [12]. Исследования продукции ИФН с целью диагностики ТБ были успешно проведены в различных европейских странах с низкой заболеваемостью туберкулезом и отсутствием массовой вакцинации БЦЖ. Представляет интерес оценка диагностических возможностей подобных тестов среди российской популяции.

Цель исследования

Для изучения иммуногенности различных антигенов MT у больных активным туберкулезом, поступивших в стационары Санкт-Петербурга и Ленинградской области, была выбрана широкая панель АГ возбудителя. Одна часть этих панелей представлена внутриклеточно экспрессируемыми АГ у медленно растущих Mtb (Rv2957, Rv2958 и Rv0447c), другая часть — как достаточно изученные секретируемые АГ, экспрес-

сируемые у быстро пролиферирующих MTt (Ag85a и ESAT-6). В исследовании для сравнительной оценки выраженности антиген-стимулируемого специфического иммунного ответа на каждый используемый АГ как среди всех пациентов, так и среди различных подгрупп участников использовался тест на продукцию ИФН в цельной крови. Этот тест при относительной простоте выполнения позволяет более достоверно оценить иммунологический статус *ex vivo* в сравнении с методикой работы с выделенными лимфоцитами [13–16].

Материалы и методы исследования

В исследование были включены 52 человека с подтвержденным диагнозом активного туберкулеза, поступивших в специализированные противотуберкулезные учреждения Санкт-Петербурга и Ленинградской области в период с августа 2011 по октябрь 2012 г. Все участники исследования соответствовали критериям включения: были в возрасте от 18 до 60 лет, имели впервые выявленный туберкулез или рецидив заболевания с изолированным поражением органов дыхания или с его сочетанием с экстраторакальными локализациями. Установление диагноза ТБ основывалось на результатах клинических, лучевых, включая компьютерную и магнитно-резонансную томографию, бактериологических (окраска мазка патологического материала по Цилю–Нильсену, посевы на жидкие (Bactec MGIT 960) и твердые (Ливенштейна–Йенсена) среды, молекулярно-генетических и гистологических методов. Взятие венозной крови для исследования производилось до начала пациентом противотуберкулезной терапии или в сроки не более чем две недели от начала приема противотуберкулезных препаратов (ПТП). Изучаемые иммунологические параметры оценивались как в целом среди всей группы пациентов, так и в подгруппах, в зависимости от их демографических, социально-эпидемиологических и клинических особенностей, включая гендерные различия, первичность выявленного случая ТБ, факторы риска развития ЛУ ТБ, бактериовыделение, лекарственную чувствительность возбудителя, наличие ВИЧ-инфекции, вирусных гепатитов В и С и других состояний. Включение пациентов осуществлялось после подписания добровольного информированного согласия на участие в исследовании. Дизайн и протокол исследования одобрены Этическим комитетом ФГБУ НИИДИ ФМБА России.

Лабораторное иммунологическое исследование, в частности тест цельной крови (ТЦК), выполнялся в соответствии со стандартными операционными процедурами (СОП) с панелью антигенов MT, ВИЧ, ЭБВ, ЦМВ и вируса гриппа. Характеристика используемых антигенов представлена в табл. 1.

Таблица 1

Использованные антигены

Антиген МТ	Тип антигена	Название	Биология	Производитель
Rv0447c	Белок	Вероятно, циклопропан ацил-фосфолипид синтетазы. ufaA1	Несекретируемый протеин, ранее известный как цель для гуморального и клеточного иммунного ответа [13, 17]. Обладает метилтрансферазной активностью. Участвует в биосинтезе липидов, а также в устойчивости к оксидативному стрессу и выживанию [18]. Экспрессируется как МТ, БЦЖ, так и атипичными микобактериями	GenScript, Piscataway, USA
Rv2957	Белок	PGL/p-HBAD гликозилтрансфераза. МТ3031	Несекретируемый протеин, ранее известный как цель для гуморального и клеточного иммунного ответа [13, 17, 18]. Гликозилтрансферазная активность, переносит гексосилные группы. Участвует в синтезе гликолипидов [19]. Известен как цель для лекарств. Экспрессируется как МТ, БЦЖ, так и атипичными микобактериями	GenScript, Piscataway, USA
Rv2958c	Белок	PGL/p-HBAD Биосинтез гликозилтрансфераз. МТ3034	Несекретируемый протеин, ранее известный как цель для гуморального и клеточного иммунного ответа [13, 17]. Участие в процессе биосинтеза гликолипидов. Гликозилтрансферазная активность [18]. Играет роль в развитии иммунного ответа/толерантности [20]. Экспрессируется как МТ БЦЖ, так и атипичными микобактериями	GenScript, Piscataway, USA
Rv3804c	Белок	Ag85A. Секретируемый антиген 85A. fbpA. МРТ59	Секретируемый антиген МТ, основная цель Т-клеточного иммунного ответа, экспрессируется на ранних стадиях инфекционного процесса. Отвечает за высокое сродство микобактерий к фибринэктину. Играет роль в синтезе клеточной стенки, обладает миколитрансферазной активностью в биосинтезе димиколята тригалозы [21]. Экспрессируется как МТ, БЦЖ, так и атипичными микобактериями. Используется в разрабатываемых вакцинах [22]	Aeras, Rockville, USA
Rv3875	Белок	ESAT-6. 6 кДа Ранний секретируемый антиген esxA	Рано экспрессируемый и синтезируемый целевой антиген [23]. Роль в патогенности МТ, за счет стимуляции апоптоза макрофагов и эпителиальных клеток легких. Кроме того, иммуномодулирующий эффект в отношении макрофагов [24]. Относится к региону RD1, представленному у МТ, но отсутствующему у БЦЖ	Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark
CMV	Белок	ЦМВ человека pp65 UL83	Структурный белок, экспрессируемый на поверхности клеток, инфицированных ЦМВ. Основной компонент оболочки субвирусной частицы; pp65 является иммунодоминантной целью для CD4 ⁺ и CD8 ⁺ Т-клеточного иммунного ответа против ЦМВ	Prospec, Ness Ziona, Israel
EBV	Белок	EBV ядерный антиген 1 EBNA-1	EBNA-1 связывается с ДНК и активирует ее репликацию из латентной фазы. Играет роль в ЭБВ опосредованном нарушении антигенпрезентации [25]	Prospec, Ness Ziona, Israel
EBV	Белок	EBV ядерный антиген 3 EBNA-3	Три взаимосвязанных ядерных протеина, экспрессируемых во время латентной ЭБВ инфекции, EBNA-3A, -3B, and -3C, важны для вызываемой ЭБВ иммунизации В-лимфоцитов <i>in vitro</i> . Является иммунодоминантным целевым регионом для иммунного ответа против ЭБВ <i>in vivo</i>	Bioclone Inc, San Diego, USA
HIV	Белок	HIV gag	Белок Gag ВИЧ-1 необходим для сборки вирусоподобных частиц, а также созревания вириона после выхода частицы из клетки и ранние этапы репликации вириона после проникновения в клетку	Prospec, Ness Ziona, Israel
HIV	Смесь протеинов	Фрагменты p17-p24, gp41-gp120	Серологически иммунодоминантный регион of p17-p24, gp41-gp120	Prospec, Ness Ziona, Israel

Антиген МТ	Тип антигена	Название	Биология	Производитель
Influenza California 2009	Смесь протеинов	Инактивированный моновалентный сплит A/H1N1/California/07/2009	Вакцина против гриппа, штамм A/H1N1/California/07/2009	Baxter Innovations GmbH, Wien, Austria
Influenza Brisbane 2007	Смесь протеинов	Инактивированный моновалентный сплит A/H1N1/Brisbane/59/2007	Вакцина против гриппа, штамм A/H1N1/Brisbane/59/2007	Baxter Innovations GmbH, Wien, Austria
Influenza Uruguay 2007	Смесь протеинов	Инактивированный моновалентный сплит A/H3N2/Uruguay/716/2007	Вакцина против гриппа, штамм A/H3N2/Uruguay/716/2007	Baxter Innovations GmbH, Wien, Austria
Influenza Florida 2006	Смесь протеинов	Инактивированный моновалентный сплит B/Florida/4/2006	Вакцина против гриппа, штамм B/Florida/4/2006	Baxter Innovations GmbH, Wien, Austria
Influenza Vietnam 2004	Смесь протеинов	Инактивированный моновалентный сплит A/H5N1/Vietnam/1203/2004	Вакцина против гриппа, штамм A/H5N1/Vietnam/1203/2004	Baxter Innovations GmbH, Wien, Austria
Influenza	Смесь 49 пептидов длиной 15 АК, перекрывающиеся на 11 АК	Белок М1	Матричный белок вируса гриппа, формирует слой внутривиральной оболочки и осуществляет энкапсуляцию РНК-нуклеопротеинового ядра в мембранную оболочку [26]	JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin, Germany

Супернатант был собран и хранился при -70°C в двух аликвотах. Материал одной аликвоты был исследован на содержание ИФН в иммуноферментном анализе (ИФА) для первичной оценки теста. Гепаринизированная разведенная венозная кровь в объеме 100 мкл (фактор разведения 1:5), вносилась в лунки предварительно подготовленных планшетов, содержащие специфические антигены в концентрации 2 мкг/мл, растворенные в 100 мкл питательной среды RPMI-1640, обогащенной L-глутамином (2нМ), содержащей пенициллин (100 МЕ/мл) и стрептомицин (10 мг/мл). Планшеты инкубировались в атмосфере, содержащей 5% углекислого газа, при температуре 37°C в течение 7 дней. Фитогемагглютинин (ФГА) использовался как положительный контроль, питательная среда без антигена — как отрицательный контроль. На 7-й день супернатант собирался и тестировался на концентрацию ИФН с использованием ИФА тест-системы МАБТЕК в соответствии с инструкцией производителя.

Полученные данные обрабатывались с использованием программных продуктов Tecan Magellan (первичная обработка), Statistica 8.0 и Graphpad PRISM 6.0 (статистический анализ).

Результаты

Средний возраст пациентов, включенных в исследование, составил $34 \pm 11,6$ года (табл. 2). Преобладали

мужчины (65,4%), половина участников (50,0%) была потребителями инъекционных наркотиков (ПИН), более 1/3 пациентов (36,5%) находились в местах лишения свободы (МЛС), четверть обследуемых имели в анамнезе контакт с больным активным туберкулезом в течение последних двух лет (25,0%), доля бездомных составила 3,8%, мигрантов — 5,8%, имели низкую приверженность к обследованию и лечению около одной трети участников (28,8%). Положительный ВИЧ-статус был установлен у более чем половины пациентов (51,9%), вирусным гепатитом С (ВГС) страдали 44,2% больных. Согласно критериям включения большинство участников имели впервые выявленные случаи туберкулеза — 82,7%, рецидив заболевания установлен у 17,3% больных. Генерализованный процесс с сочетанием туберкулеза органов дыхания с внелегочными поражениями (периферические лимфатические узлы, почки, костно-суставная система, селезенка и др.) выявлен у 9 исследуемых (17,3%), которые все имели ВИЧ-положительный статус.

По клинической структуре поражения органов дыхания, включая генерализованный процесс, были представлены преимущественно инфильтративными изменениями в легочной ткани (40,4%), диссеминация в легочной ткани, в том числе милиарные очаги встречались у 28,8% исследуемых, изолированное вовлечение внутригрудных лимфатических узлов — у 13,5%. Деструктивные изменения в легочной ткани имелись

Таблица 2

Социально-эпидемиологическая, клинко-рентгенологическая и бактериологическая характеристика обследуемых пациентов

№ п/п	Характеристика	Кол-во пациентов (n=52)	
		абс. число	%
1	Средний возраст, годы	34±11,6	
2	Мужчины	34	65,4
3	Потребители инъекционных наркотиков	26	50,0
4	Пребывание в местах лишения свободы	19	36,5
5	Тубконтакт	13	25,0
6	Бездомные	2	3,8
7	Мигранты	3	5,8
8	Низкая приверженность	15	28,8
9	ВИЧ-инфекция	27	51,9
10	Вирусный гепатит С	23	44,2
14	Впервые выявленный туберкулез	43	82,7
15	Рецидив туберкулеза	9	17,3
16	Генерализованный туберкулез	9	17,3
17	Инфильтративный туберкулез	21	40,4
18	Диссеминированный туберкулез	15	28,8
19	ТБ внутригрудных лимфоузлов	7	13,5
21	Плевральный выпот	4	7,7
22	Деструктивные изменения	14	26,9
23	Кальцинаты, рубцы, фиброз	7	13,5
24	Бактериовыделение	31	59,6

более чем у четверти участников (26,9%), следы перенесенного в прошлом туберкулеза в виде кальцинатов внутригрудных лимфатических узлов, рубцовых и фиброзных изменений в легких на фоне активного специфического процесса — у 13,5% пациентов. Бактериовыделение было обнаружено у более чем половины исследуемых (59,6%), среди которых доля пациентов с ЛУ МТ составила 45,2% (табл. 3).

Наибольшая частота ЛУ МТ составила 71,4%. В четырех случаях ЛУ МТ носила приобретенный характер (28,6%), соответственно первичная лекарственная устойчивость МТ была установлена в остальных 10 случаях (71,4%). К наиболее значимым факторам

Таблица 3

Лекарственная устойчивость МТ у больных туберкулезом с бактериовыделением

№ п/п	Характеристика	Кол-во пациентов (n=31)	
		абс. число	%
1	Лекарственно-устойчивый туберкулез (ЛУ ТБ)	14	45,2
2	Лекарственно-устойчивый туберкулез	Кол-во пациентов (n=14)	
8	К стрептомицину (S)	12	85,7
9	МЛУ ТБ	10	71,4
10	Первичная лекарственная устойчивость	10	71,4
11	Приобретенная лекарственная устойчивость	4	28,6

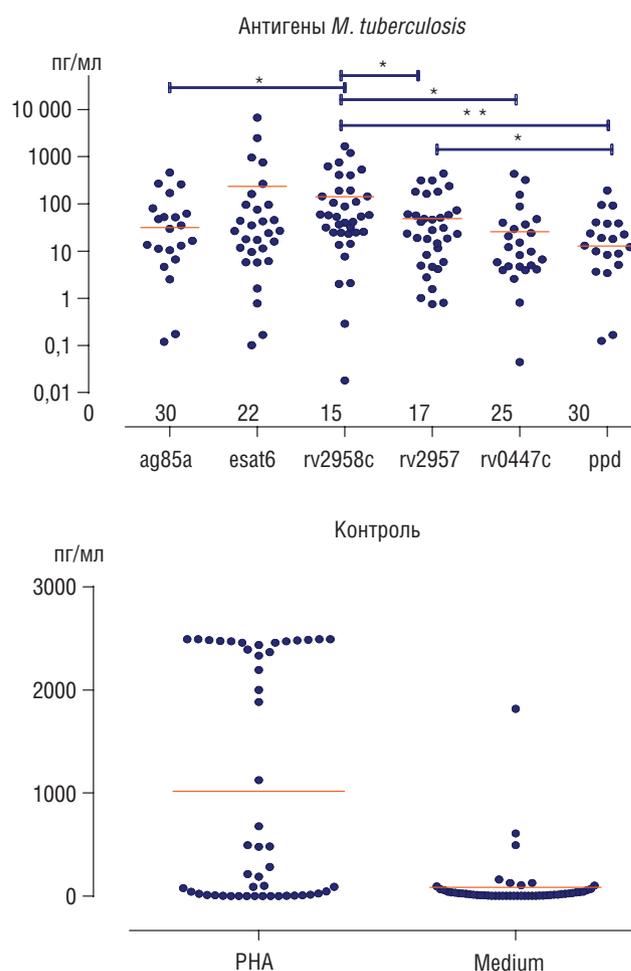


Рис. 1. Концентрация ИФН в супернатанте ТЦК после стимуляции различными белками МТ и контроль (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$)

риска развития ЛУ ТБ были отнесены известный контакт с больным ЛУ туберкулезом, пребывание в МЛС, рецидив ранее перенесенного ТБ, ВИЧ-инфекция, низкая приверженность к обследованию и лечению.

Результаты исследования продукции ИФН в ТЦК в ответ на стимуляцию специфическими антигенами МТ среди всех исследуемых пациентов приведены на рис. 1. Различия в концентрациях ИФН в супернатанте ТЦК после стимуляции белком Rv2958c и белка-

ми Ag85a, Rv2957, Rv0447c, туберкулином (142 ± 44 vs 31 ± 12 ; $p < 0,0177$; vs 49 ± 13 ; $p < 0,047$; vs 26 ± 11 ; $p < 0,0133$; vs $13 \pm 4,7$; $p < 0,0051$ соответственно) были статистически значимыми. Кроме того, достоверно различались концентрации ИФН после стимуляции Rv2957 и туберкулином (49 ± 13 vs $13 \pm 4,7$; $p < 0,0129$). Однако достоверной разницы между концентрациями ИФН после стимуляции ESAT-6 и туберкулином выявлено не было.

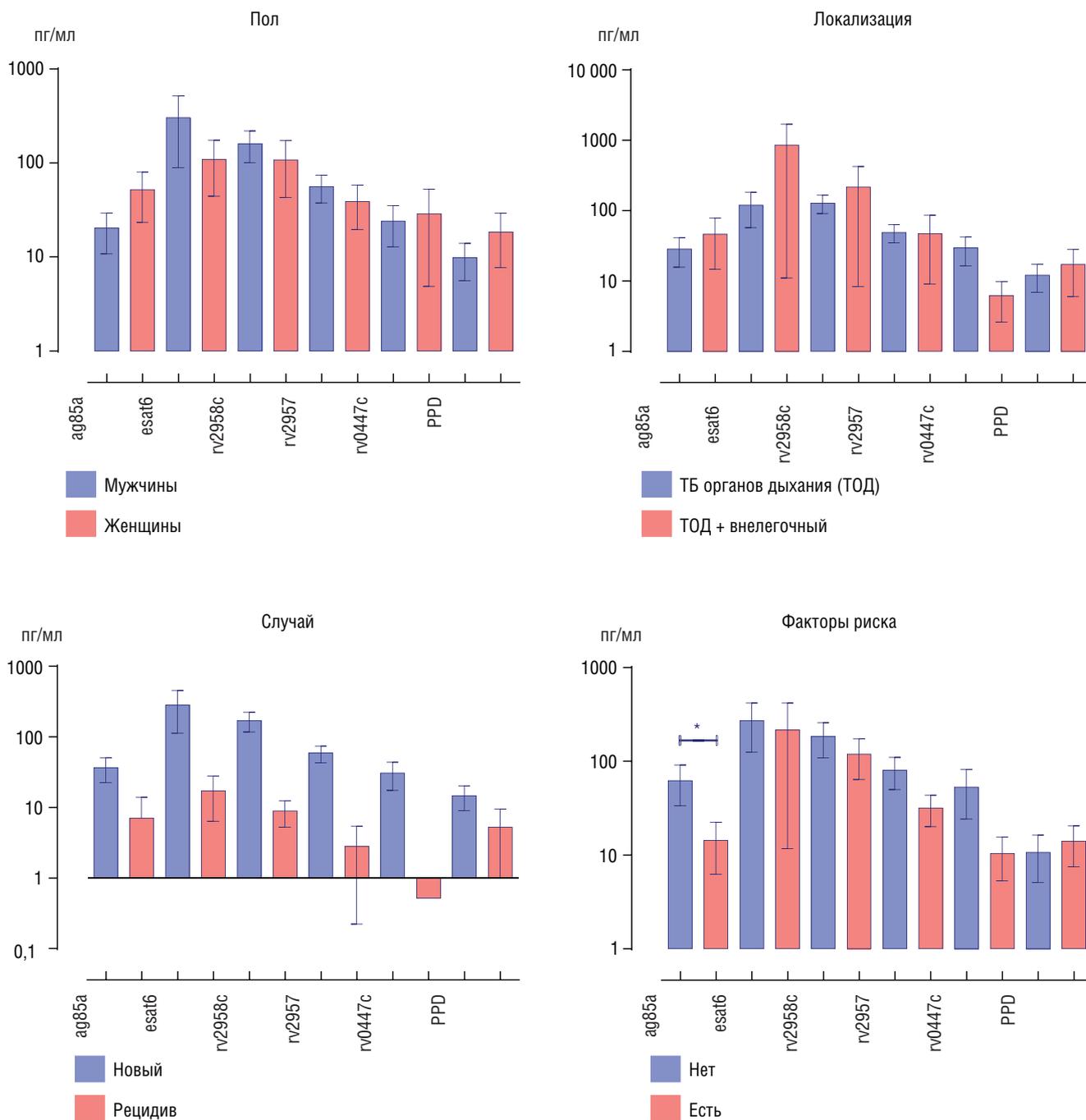


Рис. 2. Концентрация ИФН в супернатанте ТЦК у различных подгрупп пациентов после стимуляции белками МТ (* $p < 0,05$)

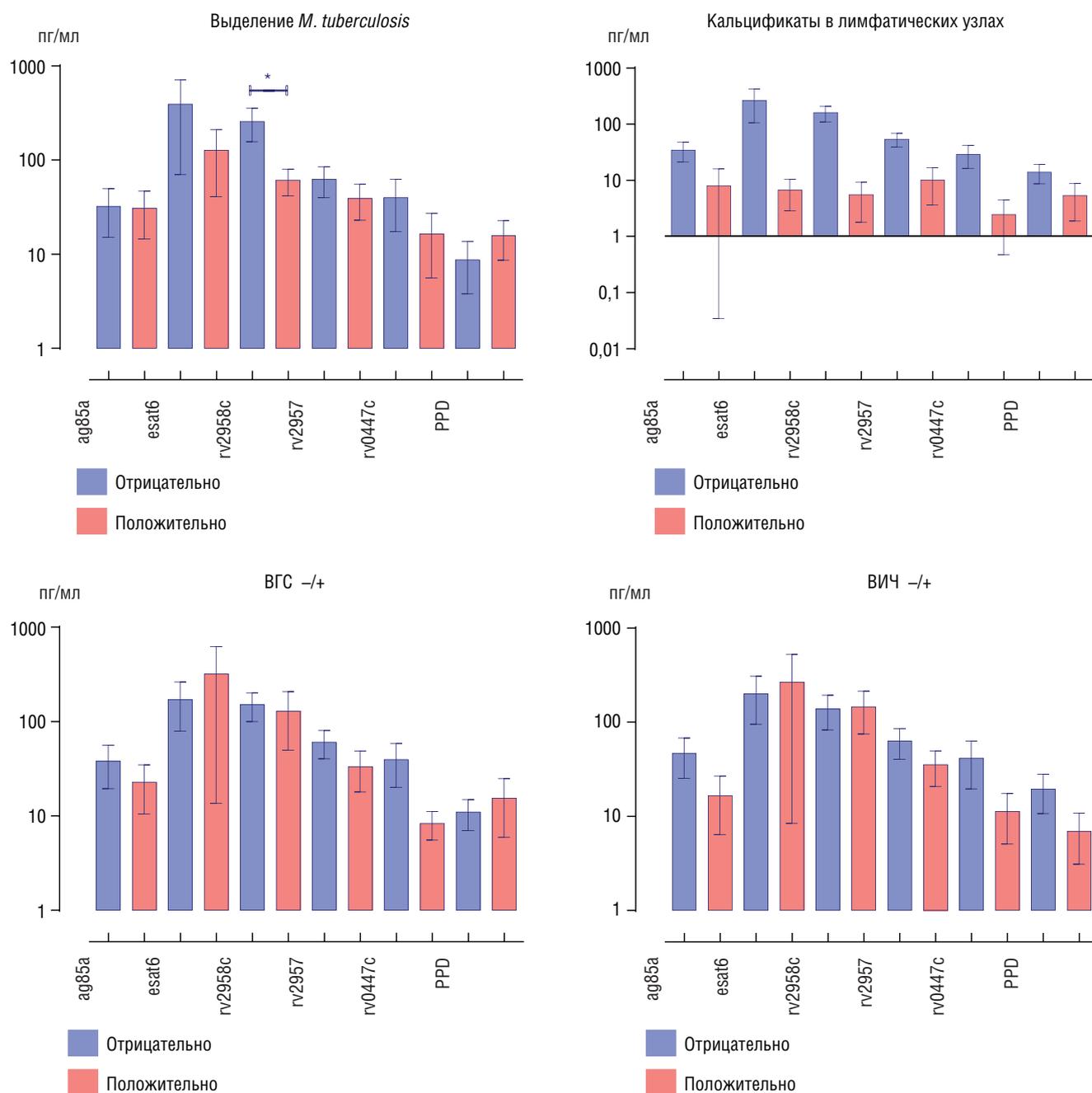


Рис. 2. Окончание. Концентрация ИФН в супернатанте ТЦК у различных подгрупп пациентов после стимуляции белками МТ (* $p < 0,05$)

На рис. 2 отражены результаты исследования концентрации ИФН в супернатанте ТЦК после стимуляции антигенами МТ в различных подгруппах.

Достоверные различия имели место между группами пациентов без факторов риска развития ЛУ ТБ и больными группы риска (63 ± 29 и $14 \pm 8,1$ соответственно; $p = 0,0483$). Также статистически значимые различия в концентрации ИФН в супернатанте ТЦК после стимуляции Rv2958c наблюдались между группами пациентов без бактериовыделения и выделявшими

МТ (257 ± 100 и 61 ± 19 соответственно; $p = 0,0276$). Следует отметить тенденцию к неспецифическому снижению иммунореактивности (без статистически значимых различий) у больных с рецидивом заболевания, со следами перенесенного в прошлом туберкулеза в виде кальцинатов в внутригрудных лимфатических узлах, рубцовых и фиброзных изменений в легочной ткани, по сравнению с пациентами с впервые выявленным процессом без старых специфических признаков поражения органов дыхания. Однако в подгруппах

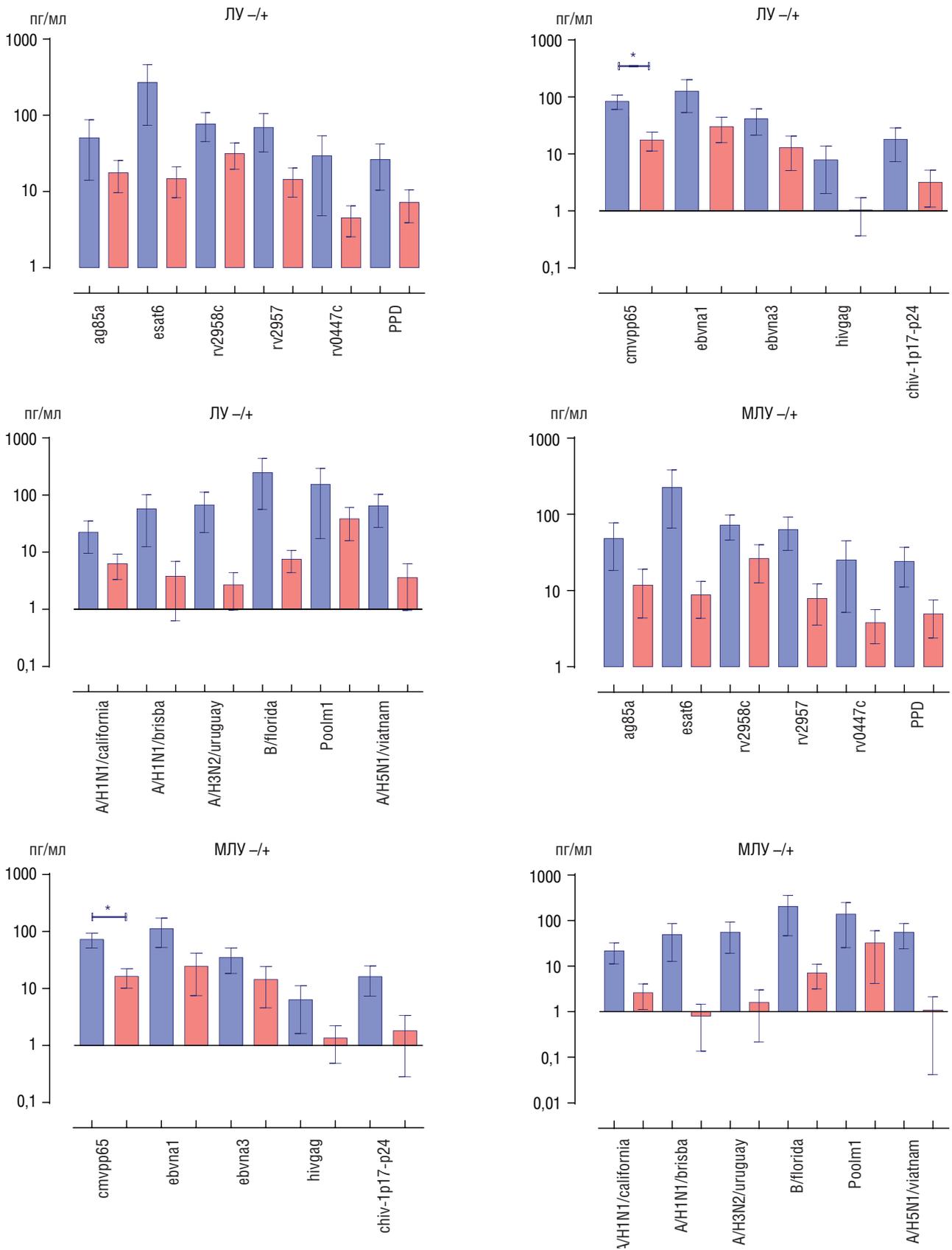


Рис. 3. Концентрация ИФН в супернатанте ТЦК после стимуляции белками МТ и различными вирусными антигенами в зависимости от лекарственной устойчивости МТ.

■ — лица с лекарственно-устойчивым туберкулезом, ■ — пациенты с сохраненной лекарственной чувствительностью МТ.

с гендерным различием (мужчины/женщины), различием локализации ТБ процесса (туберкулез органов дыхания/его сочетание с экстраторакальными поражениями), с наличием или отсутствием ВИЧ-инфекции, вирусного гепатита С такой тенденции не наблюдалось.

У лиц с лекарственно-устойчивым туберкулезом по сравнению с пациентами с сохраненной лекарственной чувствительностью МТ статистически достоверных различий в концентрации ИФН в супернатанте после стимуляции белками МТ выявить не удалось (рис. 3).

Тем не менее наблюдалась тенденция к сниженной концентрации ИФН в супернатанте ТЦК в группе пациентов с ЛУ ТБ как спонтанной (отрицательный контроль), так и индуцированной различными белками МТ. При этом анализ «часть целого» концентрации ИФН в супернатанте ТЦК после стимуляции белками

МТ показал (рис. 4), что в группе без ЛУ ТБ максимальный ответ был против белка ESAT-6 (51%), а в группе с ЛУ ТБ — против белка Rv2957 (45%).

Кроме того, при стимуляции белком CMV pp65 наблюдалось статистически достоверное различие в концентрации ИФН в супернатанте в группе пациентов с лекарственной устойчивостью МТ по отношению к больным без ЛУ ТБ, на фоне сохранения общей тенденции к меньшей концентрации ИФН в ТЦК супернатанте у пациентов с ЛУ ТБ.

Результаты исследования концентрации ИФН в супернатанте после стимуляции антигенами CMV, EBV, HIV и INFLUENZA дополнительно показаны на рис. 5. Концентрация ИФН в ТЦК супернатанте была достоверно выше после стимуляции белками CMV и EBV по сравнению с белками HIV.

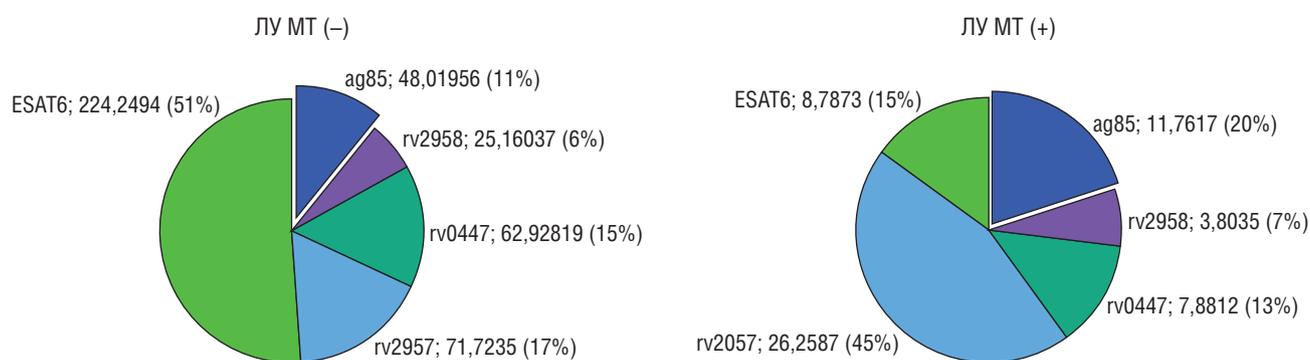


Рис. 4. Профиль иммунореактивности пациентов к антигенам МТ в зависимости от лекарственной чувствительности возбудителя туберкулеза

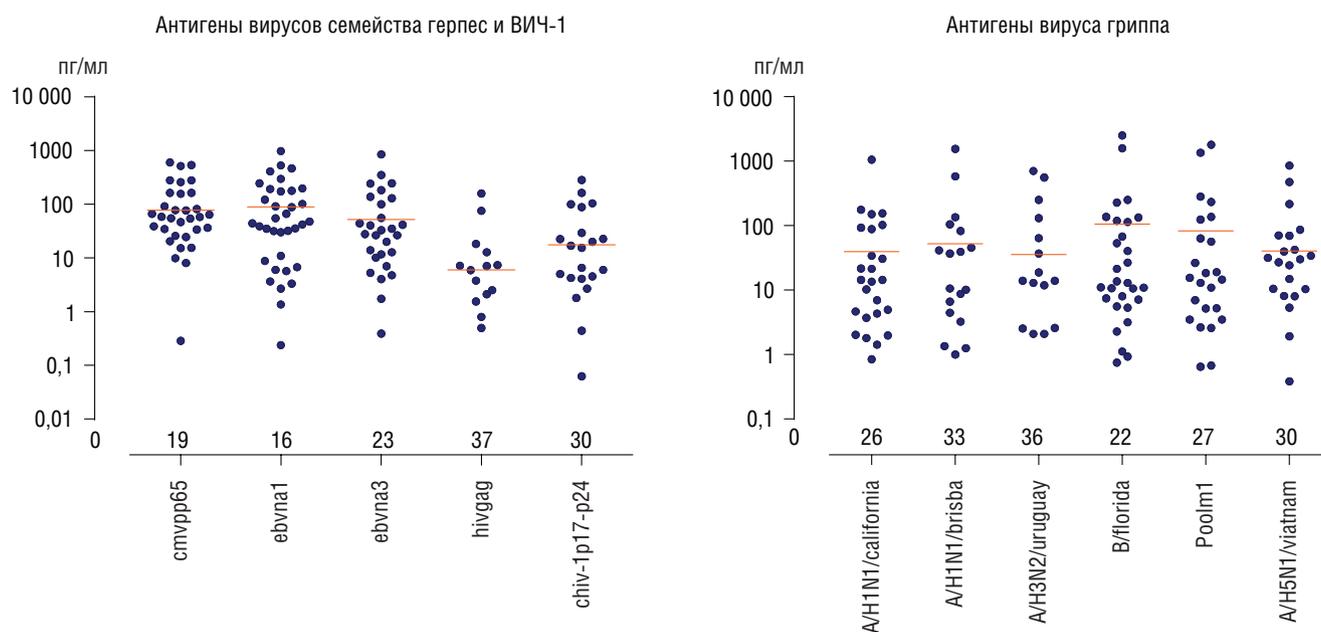


Рис. 5. Концентрация ИФН в супернатанте ТЦК после стимуляции различными вирусными антигенами

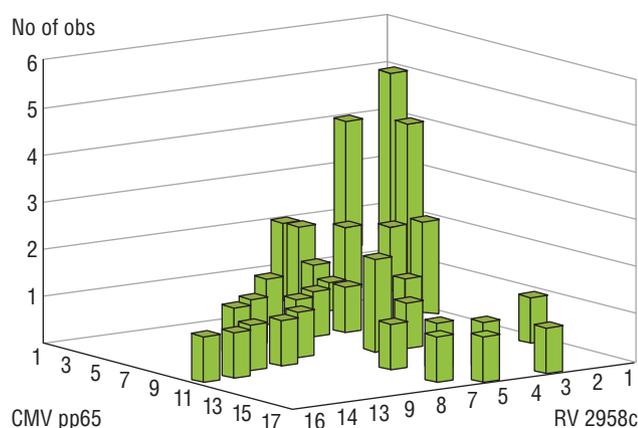


Рис. 6. Ранговый анализ иммунного ответа у пациентов исследуемой группы (CMV pp65 и RV 2958c)

Для оценки ассоциации между концентрацией ИФН в ТЦК супернатанте при стимуляции белками МТ, CMV, EBV, HIV и INFLUENZA выполнено ранжирование значений концентрации ИФН для каждого пациента: белку, стимуляция которым вызывала наибольшую концентрацию ИФН в ТЦК супернатанте у конкретного пациента, присваивалось ранговое значение 1, белок, вызывавший следующую по убыванию концентрацию ИФН — значение 2 и т.д. Затем была выполнена кросс-табуляция ранговых значений между белками МТ против CMV, EBV, HIV и INFLUENZA. Согласно данным кросс-табуляции на первом месте по максимальной концентрации ИФН, установленной у пяти пациентов, находился белок МТ Rv2958c (рис. 6). На втором месте по рангу располагался белок pp65 CMV с максимальной концентрацией, установленной у четырех больных, у которых белок Rv2958c по уровню концентрации следовал за антигеном pp65 CMV. Еще у девяти участников ранги концентрации ИФН белков pp65 и Rv2958c имели значение, меньшее или равное пяти. Для других исследуемых белков подобных закономерностей выявлено не было (данные не приводятся). Кроме того, анализ данных кросс-табуляции показал наличие ассоциации между иммунным ответом на белок Rv2958c МТ и pp65CMV у одного пациента с максимальной концентрацией ИФН в супернатанте, одинаковой для CMV и МТ.

Обсуждение результатов

Наше исследование позволило дать оценку иммуногенности ранее изученных белков МТ (Ag85a и ESAT-6), один из которых используется в коммерческом диагностическом тесте Q-GIT, в сравнении с недавно идентифицированными иммуногенными белками МТ (Rv2957, Rv2958c и Rv0447) и в сравнении с туберкулином, широко применяемым для постанов-

ки кожных проб. Следует отметить, что белок ESAT-6 не показал большей иммуногенности в сравнении с туберкулином, при довольно высоком разбросе значений концентрации ИФН в супернатанте ТЦК, что возможно говорит о значимых различиях в Т-клеточном иммунном ответе у пациентов с активным туберкулезом. В противовес этому концентрация ИФН в ТЦК супернатанте после стимуляции Rv2958c была статистически достоверно выше по отношению к туберкулину и белкам Ag85a, Rv0447c, что может свидетельствовать о возможно большей специфичности ответа на данный антиген у пациентов с активным туберкулезом. Однако наличие бактериовыделения, чаще связанное с более активным течением инфекционного процесса и с более сильной антиген-стимуляцией, было ассоциировано с достоверно сниженным Т-клеточным иммунным ответом на данный белок (Rv2958c).

Также необходимо отметить наблюдавшуюся тенденцию к сниженной иммунореактивности пациентов с рецидивом туберкулезного процесса и ЛУ туберкулезом, что ранее описывалось и другими авторами [8]. Важно наблюдение достоверно сниженной иммунореактивности по отношению к белку Ag85a (одному из основных компонентов клеточной мембраны МТ) у пациентов группы риска ЛУ ТБ, при отсутствии достоверных различий в иммунореактивности к белкам, участвующим во внутриклеточном обмене веществ МТ.

Интересными представляются выявленные различия в профиле иммунореактивности пациентов по отношению к различным антигенам в зависимости от лекарственной чувствительности МТ: более низкая иммунореактивность в отношении ESAT-6 и более высокая — в отношении Rv2957 у пациентов с ЛУ ТБ по сравнению с больными с сохраненной чувствительностью МТ. Необходимо указать на стабильные значения иммунного ответа в отношении Rv2958c вне зависимости от наличия или отсутствия ЛУ МТ. Также интересен факт наблюдения достоверно сниженной иммунореактивности у пациентов с ЛУ ТБ в отношении антигена pp65 CMV, что возможно отражает общее угнетение иммунного ответа, ассоциированного с ЛУ ТБ, но, с другой стороны, может свидетельствовать о роли цитомегаловирусной инфекции в развитии феномена ЛУ МТ. В пользу последнего говорит выявленная ассоциация иммунного ответа на данный белок и Rv2958c МТ. Однако данное предположение требует дальнейшего скрупулезного изучения.

Выводы

1. Антиген MTRv2958 является наиболее сильным иммуногеном вне зависимости от лекарственной

чувствительности МТ. Белок Rv2957 и в меньшей степени Ag85a также вызывают достаточно сильный специфический иммунный ответ и имеют ассоциацию с ЛУ ТБ. Перечисленные антигены представляют интерес для дальнейшего изучения с целью разработки как новых диагностических тест-систем, так и иммуноориентированной терапии. При этом белок ESAT-6 продемонстрировал весьма высокий разброс значений концентрации

ИФН при отсутствии значимых различий в сравнении с туберкулином.

2. Феномен ЛУ ТБ ассоциирован со сниженной специфической и неспецифической иммунореактивностью.
3. Возможная роль вирусной коинфекции, в особенности CMV, в формировании специфического иммунного ответа на МТ требует дальнейшего скрупулезного изучения.

Конфликт интересов

Авторы не имеют финансового и этического конфликта интересов.

Благодарности

Авторы выражают благодарность за помощь в проведении исследования администрации и сотрудникам ГКУЗ ЛО «Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями».

Данное исследование выполнено при поддержке гранта Шведского агентства по международному развитию (SIDA).

Список литературы

1. ВОЗ. Глобальный доклад о туберкулезе (резюме), 2017 год. Женева, 2017. 6 с. VOZ. Globalny doklad o tuberculoze (rezюме), 2017 god. Geneva, 2017. 6 s.
2. WHO. Global Tuberculosis Report 2017. Geneva, 2017. 147 p.
3. UNAIDS. Global AIDS Update 2017. July 2017. UNAIDS. AIDSinfo website; accessed July 2017. UNAIDS. Core Epidemiology Slides; June 2017. URL: <http://aidsinfo.unaids.org/>.
4. Yablonskiy P.K., Vigel A.A., Galkin V.B., Shulgina M.V. Tuberculosis in Russia, its history and its status today // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2015. Vol. 191, N 4. P. 372–376.
5. Васильева И.А., Белилковский Е.М., Борисов С.Е., Стерликов С.А. Заболеваемость, смертность и распространенность как показатели бремени туберкулеза в регионах ВОЗ, странах мира и в Российской Федерации. Часть 2. Заболеваемость и распространенность туберкулеза // *Туберкулез и болезни легких*. 2017. Т. 95, N 7. С. 8–16. Vasileva I.A., Belilovskiy E.M., Borisov S.E., Sterlikov S.A. Zaboлеваemost, smertnost i rasprostranennost kak pokazateli bremeni tuberculeza v regionah VOZ, stranah mira b v Rossiyskoy Federatsii. Chast 2. Zaboлеваemost i rasprostranennost tuberculeza // *Tuberculez i bolezni legkih*. 2017. T. 95, N 7. S. 8–16.
6. Яблонский П.К., Васильев В.И., Соколов Е.Г. Роль хирургии в диагностике и лечении туберкулеза легких // *Вестник Санкт-Петербургского университета. Медицина*. 2016. № 3. С. 64–70. Yablonskiy P.K., Vasilev V.I., Sokolovich E.G. Rol khirurgii v diagnostic i lechenii tuberculeza legkhikh // *Vestnik Saint-Peterburgskogo universiteta. Medicina*. 2016. N 3. S. 64–70.
7. Нечаева О.Б. Эпидемическая ситуация по туберкулезу среди лиц с ВИЧ-инфекцией в Российской Федерации // *Туберкулез и болезни легких*. 2017. Т. 95, N 3. С. 13–19. Nechaeva O.B. Epidemicheskaya situatsiya gj tuberculezu sredi lits s VICH-infectsiev v Rossiyskoy Federatsii // *Tuberculez i bolezni legkih*. 2017. T. 95, N 3. S. 13–19.
8. Cagatay T., Kilicaslan Z., Cagatay P. et al. TNF-alpha antagonist therapy modify the tuberculin skin test response // *Rheumatol. Int*. 2011. Vol. 31, N 9. P. 1147–1151.
9. Старшинова А.А., Пантелеев А.М., Васильева Е.В. и др. Применение современных иммунологических методов в диагностике туберкулеза у пациентов с ВИЧ-инфекцией // *Журнал инфектологии*. 2015. Т. 7, № 3. С. 126–130. Starschinova A.A., Panteleev A.M., Vasileva E.V. i dr. Primenenie sovremennykh immunologicheskikh metodov v diagnostice tuberculeza u patsientov s VICH-infectsiev // *Jurnal Infectologii*. 2015. T. 7, N 3. С. 126–130.
10. Писаренко М.С. Особенности секреции интерферона-гамма при лекарственно-устойчивом туберкулезе легких // *Фундаментальные исследования*. 2013. № 9 (часть 3). С. 444–447. Pisarenko M.S. Osobennosti sekretsii interferone-gamma pri lekarstvenno-ustoychivom tuberculeze legkih // *Fundamentalniy Issledovaniya*. 2013. N 9 (chast 3). S. 444–447.
11. Dewan P.K., Grinsdale J., Kawamura L.M. Low sensitivity of a whole-blood interferon-gamma release assay for detection of active tuberculosis // *Clin. Infect. Dis*. 2007. Vol. 44, N 1. P. 69–73.
12. Hammond A.S., Klein M.R., Corrah T. et al. Mycobacterium tuberculosis genome-wide screen exposes multiple CD8 T cell epitopes // *Clin. Exp. Immunol*. 2005. Vol. 140, N 1. P. 109–116.
13. Ahmed R.K., Rohava Z., Balaji K.N. et al. Pattern recognition and cellular immune responses to novel Mycobacterium tuberculosis antigens in individuals from Belarus // *BMC Infect Dis*. 2012. Vol. 12. P. 41.
14. De Groote D., Zangerle P.F., Gevaert Y. et al. Direct stimulation of cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, IL-2, IFN-gamma and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation // *Cytokine*. 1992. Vol. 4, N 3. P. 239–248.
15. Kirchner H., Kleinicke C., Digel W. A whole-blood technique for testing production of human interferon by leukocytes // *J. Immunol. Methods*. 1982. Vol. 48, N 2. P. 213–219.
16. Kiran B., Cagatay T., Clark P. et al. Can immune parameters be used as predictors to distinguish between pulmonary multi-drug-resistant and drug-sensitive tuberculosis? // *Arch. Med. Sci*. 2010. Vol. 6, N 1. P. 77–82.
17. Gaseitsiwe S., Valentini D., Mahdavi S. et al. Pattern recognition in pulmonary tuberculosis defined by high content peptide

- microarray chip analysis representing 61 proteins from *M. tuberculosis* // *PLoS One*. 2008. Vol. 3, N 12. P. e3840.
18. Yuan Y., Mead D., Schroeder B.G. et al. The biosynthesis of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. Enzymatic methyl(ene) transfer to acyl carrier protein bound meromycolic acid *in vitro* // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273, N 33. P. 21282–21290.
 19. Perez E., Constant P., Lemassu A. et al. Characterization of three glycosyltransferases involved in the biosynthesis of the phenolic glycolipid antigens from the *Mycobacterium tuberculosis* complex // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279, N 41. P. 42574–42583.
 20. Neill M.A., Klebanoff S.J. The effect of phenolic glycolipid-1 from *Mycobacterium leprae* on the antimicrobial activity of human macrophages // *J. Exp. Med.* 1988. Vol. 167, N 1. P. 30–42.
 21. Belisle J.T., Vissa V.D., Sievert T. et al. Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis // *Science*. 1997. Vol. 276, N 5317. P. 1420–1422.
 22. Hoff D.F., Blazevic A., Stanley J. et al. A recombinant adenovirus expressing immunodominant TB antigens can significantly enhance BCG-induced human immunity // *Vaccine*. 2012. Vol. 30, N 12. P. 2098–2108.
 23. Sorensen A.L., Nagai S., Houen G. et al. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis* // *Infect Immun*. 1995. Vol. 63, N 5. P. 1710–1717.
 24. Derrick S.C., Morris S.L. The ESAT6 protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression // *Cell Microbiol.* 2007. Vol. 9, N 6. P. 1547–1555.
 25. Levitskaya J., Coram M., Levitsky V. et al. Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 // *Nature*. 1995. Vol. 375, N 6533. P. 685–688.
 26. Sha B., Luo M. Structure of a bifunctional membrane-RNA binding protein, influenza virus matrix protein M1 // *Nat. Struct. Biol.* 1997. Vol. 4, N 3. P. 239–244.

Поступила в редакцию 01.03.2018 г.

Сведения об авторах:

Задьин Зинаида Моисеевна — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник научно-методического отдела Санкт-Петербургского научно-исследовательского института фтизиопульмонологии; 191036, Санкт-Петербург, Лиговский пр., д. 2–4; e-mail: dinmetyan@mail.ru;

Макаренко Ольга Александровна — врач-лаборант, лаборатория иммунологических и аллергологических исследований Научно-исследовательского института детских инфекций Федерального медико-биологического агентства; 197022, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 9; e-mail: makarenko_oa@mail.ru;

Жирков Антон Анатольевич — младший научный сотрудник отдела клинической лабораторной диагностики Научно-исследовательского института детских инфекций Федерального медико-биологического агентства; 197022, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 9; e-mail: ant-zhirkov@yandex.ru;

Луцкий Антон Александрович — кандидат медицинских наук, научный сотрудник отдела вирусных гепатитов и заболеваний печени Научно-исследовательского института детских инфекций Федерального медико-биологического агентства; 197022, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 9; e-mail: anton.lutckii@hotmail.com;

Ferrara Giovanni — PhD, MD, Senior consultant/associate researcher, Karolinska Institute, Respiratory Medicine Unit, Dept of Medicine, Karolinska Institutet, Stockholm Sweden / Lung Allergi Kliniken, Karolinska University Hospital, Solnavägen 1, Solna; Alfred Nobels Allé 8, HuddingeStockholm Sweden; Assistant Professor, Section of Respiratory Medicine, Dept of Internal Medicine, University of Perugia, Perugia, Italy; e-mail: giovanni.ferrara@ki.se;

Axelsson-Robertson Rebecca — PhD, Post Doc, Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology, Karolinska Institute, Solnavägen 1, Solna; Alfred Nobels Allé 8, Stockholm, Sweden, rebecca.axelsson@ki.se;

Magalhaes Isabelle — PhD, Research Associate, CAST, Karolinska University Hospital, Solnavägen 1, Solna; Alfred Nobels Allé 8, Stockholm, Sweden; e-mail: isabelle.magalhaes@ki.se;

Скрынник Наталья Алексеевна — кандидат медицинских наук, главный врач Противотуберкулезного диспансера № 12; 190103, Санкт-Петербург, наб. реки Фонтанки, д. 152а; e-mail: skrinik@rambler.ru;

Шабалин Виктор Николаевич — заместитель главного врача по лечебной работе Зеленохолмской противотуберкулезной больницы; 188825, Ленинградская область, пос. Зеленый Холм;

Джумаева Халима Назаровна — заведующая отделением для больных ВИЧ/ТБ Зеленохолмской противотуберкулезной больницы; 188825, Ленинградская область, пос. Зеленый Холм;

Арчакова Людмила Ивановна — доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник, заместитель главного врача Санкт-Петербургского научно-исследовательского института фтизиопульмонологии; 191036, Санкт-Петербург, Лиговский пр., д. 2–4; доцент кафедры госпитальной терапии Санкт-Петербургского государственного университета; 199034, Санкт-Петербург, Университетская набережная, д. 7–9; e-mail: spbniif_a@mail.ru;

Maeurer Markus Joseph — MD, PhD, FRCP (London), Professor, Division Therapeutic Immunology (TIM), LABMED and MTC, Karolinska Institutet, CAST, Karolinska Hospital, Solnavägen 1, Solna; Alfred Nobels Allé 8, Stockholm, Sweden; e-mail: markus.maeurer@ki.se;

Сидоренко Сергей Владимирович — доктор медицинских наук, профессор, руководитель отдела молекулярной микробиологии и эпидемиологии Научно-исследовательского института детских инфекций Федерального медико-биологического агентства; Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 9; e-mail: sidorserg@gmail.com;

Лобзин Юрий Владимирович — доктор медицинских наук, профессор, академик РАМН, директор Научно-исследовательского института детских инфекций Федерального медико-биологического агентства; Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 9; e-mail: niidi@niidi.ru.