

А.В. Москалев, В.Б. Сбойчаков,
А.В. Апчел, В.Н. Цыган

Современная характеристика биологии и перспективы диагностики штаммов *M. tuberculosis*

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

Резюме. Рассмотрены особенности биологии *M. tuberculosis*, включающие современные данные об особенностях морфологии, антигенных структурах различной природы, определяющих вирулентность возбудителей туберкулеза. На основании данных сполитипирования охарактеризованы генетические различия семейств *Mycobacteriaceae*, а среди них – штаммы генотипа *Beijing*, отличающиеся широкой распространенностью в Российской Федерации и высокой лекарственной устойчивостью. На основании сложной антигенной структуры *M. tuberculosis* отражены особенности развития иммунного ответа, которые позволяют прогнозировать течение инфекционного процесса. Представленные характеристики отражают значительную неоднородность штаммов *M. tuberculosis*, которая сочетается с разнообразием иммунного гомеостаза носителей заболевания, и тем самым существенно осложняет лабораторную диагностику туберкулеза. Среди рассмотренных современных методик диагностики туберкулезной инфекции самыми перспективными могут быть иммунологические. Одним из способов усовершенствования серодиагностических методик, способствующих повышению чувствительности серодиагностики туберкулеза, является создание полиэпитопных химерных антигенов путем химической конъюгации белков с углеводными молекулами. Другим направлением повышения чувствительности может стать создание композиций (коктейля) из нескольких иммунодоминантных антигенов *M. tuberculosis*, что позволит значительно снизить число ложноположительных результатов. Создание гибридных белков позволит избежать снижения аффинности антител сыворотки крови, возникающее при использовании нескольких антигенов одновременно.

Ключевые слова: микобактерии, семейство, штаммы, тип, антитела, антигены, миколовые кислоты, иммунодиагностика, гены, генотип, генетическая линия.

Одной из приоритетных задач отечественного здравоохранения является улучшение эпидемиологической ситуации по туберкулезу. По данным Всемирной организации здравоохранения, Российская Федерация (РФ) входит в список 22 стран с высоким бременем туберкулеза, на которые приходится около 80% случаев данного заболевания в мире. К сожалению, согласно ее оценке, до 20% новых случаев туберкулеза в России остаются не диагностированными в течение года [8, 16]. При этом каждый невыявленный больной с активной формой туберкулеза ежегодно может заразить до 15 человек, а риск возникновения заболевания у тубинфицированных лиц составляет от 15 до 50% уже в течение первых двух лет после контакта с больным [13, 28].

Таким образом, проблема туберкулеза остается по-прежнему актуальной спустя многие годы. Это связано, в первую очередь, с особенностями биологии возбудителя. Так род *Mycobacterium* включает около 160 видов. К тому же отдельные признаки микобактерий сопоставимы с грибами. Например, способность к образованию вегетативных форм, характерный медленный рост [5, 23]. *M. tuberculosis* относится к царству *Bacteria*, типу *Actinobacteria*, классу *Actinobacteridae*, подклассу *Actinomycetales*, отряду *Firmicutes*, подотряду *Corynebacterineae*, семейству *Mycobacteriaceae*, роду *Mycobacterium* [2, 24]. *M. tuberculosis* – это вид микобактерий, которые

вызывают хроническое инфекционное заболевание человека и животных – туберкулез, который разнообразен в клинических проявлениях, наиболее часто поражающий систему органов дыхания, но возможны поражения мочеполовой, нервной систем, желудочно-кишечного тракта, суставов, кожи и периферических лимфатических узлов [11]. *M. tuberculosis* отличаются особым строением клеточной стенки, что является одним из факторов, определяющих их устойчивость. Клеточная стенка содержит большое количество жирных микотиоловых кислот, ковалентно связанных с пептидогликаном и полисахаридом арабиногалактаном, обеспечивая тем самым мощный липидный барьер. Отличительной особенностью *M. tuberculosis* является кислото-, спирто- и щелочеустойчивость, что так же обусловлено высоким содержанием липидов и восков в клеточной стенке бактерии [2]. Бактерии устойчивы и ко многим антисептическим и дегидратирующим веществам, средствам на основе четвертичного аммония, которые на другие микроорганизмы оказывают губительное влияние.

Выраженная внешняя капсула отсутствует, но имеется полисахаридная микрокапсула, отделенная от клеточной стенки осмиефобной зоной, которая обеспечивает микобактериям высокую устойчивость к неблагоприятным воздействиям внешней среды [25]. Таким образом, среди основных антигенных структур *M. tuberculosis* содержатся белки, липиды, полисахариды.

риды и фосфатиды. Преобладают среди них липидные фракции. Антигенные особенности *M. tuberculosis*, а также *M. microti* и *M. bovis* имеют значительное сходство. Антигенные связи у микобактерий установлены не только среди видов, но и у родов. В штаммах *M. tuberculosis* выделяется 10 антигенных компонентов. К ним относятся, например, корд-фактор, или туберкулиновые протеиды, который играет важнейшую роль в жизненном цикле туберкулёзной палочки. В состав молекулы корд-фактора входит невосстанавливающийся дисахарид трегалоза, которая также является составной частью фосфоглюкана, а также миколовая и миколиновая жирные кислоты. Важнейшее свойство корд-фактора – высокая токсичность. Также в его функции входит и защита бактериальных клеток от окислительного фосфорилирования в макрофагальных митохондриях, то есть корд-фактор необходим для предохранения микобактерии от фагоцитоза. Микобактерии туберкулёза являются внутриклеточными микроорганизмами, и именно с этим связана их значительная способность персистировать. После первичного инфицирования макрофагов хозяина они организуют специфическую стратегию выживания и размножения в них. Микобактерии пользуются способностью макрофагов образовывать специализированные органеллы (фагосомы) и приспособливают их для поддержания своей жизнедеятельности. При этом они получают ощутимые преимущества, которые используются для того, чтобы избежать действия защитных механизмов хозяина, например специфических антител и микробицидных эффектов системы комплемента [3, 11, 26, 32].

У микобактерий имеется специальный маннозный рецептор, а также рецепторы для компонентов системы комплемента (CR1, CR3 и CR4), которые предназначены для связывания с мембраной макрофага и фагоцитирования внутрь клетки. Внутри фагосомы происходит её ремоделинг, причём таким образом, что прерывается весь процесс её созревания, и в итоге нарушается образование фаголизосомы.

Данные особенности корд-фактора делают его одним из основных факторов вирулентности туберкулёзных палочек. Туберкулиновый протеин (туберкулин) характеризуют ярко выраженные аллергенные свойства, заключающиеся в развитии реакции гиперчувствительности IV типа в ответ на попадание данного антигена в организм [4, 27].

Популяция *M. tuberculosis* обладает выраженной генетической неоднородностью, что объясняется разнообразием генетических характеристик штаммов возбудителя. Специфические для штаммов генетические характеристики обуславливают различия в иммунном ответе хозяина на инфекцию, спектр лекарственной устойчивости возбудителей, клинические, патогенетические и эпидемиологические особенности заболевания. Такими характеристиками являются: большое число повторяющихся последовательностей дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), наличие в геноме микобактерий генов метаболизма жирных кис-

лот, способность генов микобактерий синтезировать незаменимые аминокислоты, витамины, кофакторы и кодировать ферменты, участвующие в липолизе и липогенезе [1, 10, 18].

Благодаря сполиготипированию в настоящее время выделяют 36 генетических семейств *M. tuberculosis*. Сполиготипирование – методика типирования микобактерий туберкулеза, основанная на анализе полиморфизма хромосомного локуса DR (англ. direct repeat – прямой повтор), который содержит варьирующее число коротких прямых повторов, разделённых уникальными последовательностями (спейсерами). Продукты полимеразной цепной реакции (ПЦР), проводимой с помощью праймеров, комплементарных прямым повторам, гибридизуют с набором синтетических олигонуклеотидов, ковалентно пришитых к нитроцеллюлозной мембране. Картина гибридизации является сполиготипом каждого штамма [19, 28]. Среди 36 генетических семейств выделяют девять суперсемейств микобактерий туберкулёзного комплекса: *M. Beijing* (пекинское семейство), *M. africanum*, *M. bovis*, EAI (англ., East African-Indian – восточноафрикано-индийское семейство), CAS (англ., Central Asian – центрально-азиатское семейство), T (широко распространённое, но недостаточно изученное семейство), *Haarlem* (европейское семейство с малым количеством копий IS6110, широко распространённое так же в Соединённых Штатах Америки и Великобритании), LAM (англ., Latin American and Mediterranean – латиноамерикано-средиземноморское семейство) [30, 34].

Генетическое семейство *M. africanum* (nAfri = 180 штаммов) является субклассом *M. tuberculosis* complex и характеризуется отсутствием 8-го, 9-го и 39-го сигналов в профиле гибридизации по данным сполиготипирования [34]. Данное генетическое семейство распространено преимущественно в Западной Африке, а также в Сенегале, Мали.

Генетическое семейство T является наиболее филогенетически древним и наиболее многочисленным, включает более 1,5 тысяч штаммов *M. tuberculosis*. Оно характеризуется наличием 31-го, а также 9-го и 10-го сигналов гибридизации, по крайней мере, одного сигнала в 21–24 позициях и одновременным отсутствием 33–36-го сигналов в профиле гибридизации [29, 34].

Генетическое семейство EAI (nEAI = 907 штаммов) классифицируется по наличию, по крайней мере, одного сигнала в 1–30-й позициях и одновременно отсутствию 29–32-го и 34-го сигналов в профиле гибридизации [34]. Семейство *Haarlem* (nHaarlem = 1034 штаммов) характеризует наличие, по крайней мере, одного сигнала в 1–30-й позициях с и одновременное отсутствие в профиле 31-й гибридизации, а также 33–36-го сигналов [13, 34]. Генетическое семейство LAM включает два подсемейства: LAM-1 (nLAM-1 = 819 штаммов) и LAM-2 (nLAM-2 = 294 штамма) и характеризуется одновременным отсутствием 21–24-го и 33–36-го сигналов, а также присутствием,

по крайней мере, одного сигнала в 1–30-й позициях [10, 34]. Семейство X ($nX = 1186$ штаммов) имеет в профиле гибридизации одновременное отсутствие 18-го и 33–36-го сигналов или, иногда одновременное отсутствие 18-го и 39–42-го сигналов [10, 34].

На сегодняшний день наибольшее внимание исследователей во всем мире привлекает генетическая линия *Beijing*. Штаммы генотипа *Beijing* характеризуются сполиготипом SIT 1 (от англ. Spoligotype International Type – международный сполиготип), который определяется наличием в DR локусе 9 из 43 спейсеров (с 35-го по 43-й) [1, 10, 34]. Внутри генотипа исследователи выделяют от 2 до более десятка групп. Чаще дифференциация носит условный характер и зависит от выбранной методики типирования. Согласно данным сполиготипирования, штамм *Beijing* обладает уникальным генотипом, в связи с чем в процессе эволюции он приобрел лекарственную устойчивость.

Второе название семейства – пекинское, так как впервые оно было обнаружено в гистологических препаратах легочной ткани больных предместья Пекина. Отличительная особенность этого генетического семейства – повсеместная широкая распространенность, но при этом доминирующее положение оно занимает не во всех географических регионах. Наибольшая частота встречаемости штаммов *M. tuberculosis* вариант *Beijing* зафиксирована в странах Юго-Восточной Азии – 43,1% (Китай, Индонезия, Япония, Вьетнам), наименьшая – в Южной Америке – 0,65% (Бразилия, Аргентина). Для Европы характерен низкий уровень распространенности генотипа *Beijing* – 7,1%. Россия по данному показателю занимает первое место среди европейских стран [10, 29]. В структуре популяции возбудителей туберкулеза в России доля штаммов *Beijing* по различным данным составляет от 50 до 80%. На территории Санкт-Петербурга к генетическому семейству *Beijing* принадлежит 81,2% изученных штаммов [3, 10].

Кроме выраженной лекарственной устойчивости, штамм обладает уникальными свойствами, которые позволили ему распространиться по всему миру. Этими свойствами являются: способность «ускользнуть» от БЦЖ-вакцинирования; относительно быстро приобретать устойчивость к противотуберкулезным препаратам [3, 11]. Если рассматривать эндемичные штаммы, то наибольший контраст проявляется при сопоставлении данных из России, где около 20% представителей генотипа *Beijing* несут лекарственную устойчивость, и данных из Китая и Японии, где практически все штаммы являются чувствительными к проводимой противотуберкулезной терапии. Ветвь современных штаммов генотипа *Beijing* несет мутаторный генотип. Объясняется это найденными мутациями в генах системы репарации *mutT2*, *mutT4* и *ogt*. Это может приводить к изменению скорости накопления мутаций, в том числе в генах, ассоциированных с лекарственной устойчивостью [11, 35].

Также большой интерес представляют исследования вирулентности *Beijing*. Данному штамму свойственна гипервирулентность, что подтверждено большим количеством исследований как на уровне макрофагальных моделей, так и на эпидемиологическом уровне [1, 10, 11]. С распространенной лекарственной устойчивостью *M. tuberculosis* связано формирование «скрытого резервуара». После первичного инфицирования в организме пожизненно сохраняется очаг эндогенной инфекции, который способен к реактивации. Этим же объясняется и невозможность полной ликвидации туберкулеза.

Вторыми по распространенности на территории РФ генетическими семействами *M. tuberculosis* являются штаммы латиноамерикано-средиземноморских семейств – *LAM* и *Haarlem*. На территории Северо-Запада России доля данного генетического семейства составляет 14,5% в случае семейства *LAM* и 13,3% в случае *Haarlem* [6]. В Санкт-Петербурге преобладающим генетическим семейством является *LAM* – 14,1% [1, 7, 10].

Кроме того, на территории РФ было выявлено такое генетическое семейство, как *Ural*, характерное в большей степени для Уральского региона, Саратовской и Омской областей.

Таким образом, существует значительная неоднородность штаммов *M. tuberculosis*, которая сочетается с разнообразием иммунного гомеостаза носителей заболевших, и тем самым существенно осложняет лабораторную диагностику туберкулеза. Для понимания этих сложностей необходимо рассмотреть некоторые особенности развития противотуберкулезного иммунного ответа.

Длительный период времени диагностика туберкулеза, основанная на факторах гуморального иммунного ответа, считалась неэффективной и неоправданной, так как основной механизм защиты организма против *M. tuberculosis* – это клеточно-опосредованный иммунитет. Тем не менее, гуморальный иммунитет является достаточно ранним «свидетелем» инфицирования *M. tuberculosis*, и при активном туберкулезном процессе в сыворотке крови больных туберкулезом обнаруживается повышенный титр противотуберкулезных антител [9, 14, 16].

Однако, несмотря на то, что *M. tuberculosis* является преимущественно внутриклеточным микроорганизмом, ярко выраженной поляризации иммунного ответа в сторону Th1-типа не происходит. Это связано с тем, что дифференцировку «наивных» Т-хелперов в сторону Th1- или Th2 регулируют многие факторы: локальное цитокиновое микроокружение, наличие гормонов, тип антигенпрезентирующих клеток (АПК), стимулирующих Т-клетки, количество и природа антигена, плотность Т-клеточных рецепторов (TCR), сила сигнала – суммарная аффинность связи TCR с антигеном. У человека, в отличие от инбредных мышей, нет строгого разделения профилей секретируемых цитокинов между Th1 и Th2. Например, Th1 могут секретировать интерлейкин (ИЛ)-10 и ИЛ-13. Главным

отличием между популяциями клеток является секреция γ -интерферона (γ -ИНФ), ИЛ-12 первым, а ИЛ-4 – вторым типами Т-хелперов. Экспериментальные исследования убедительно демонстрируют наличие взаимозависимости и синергии между клеточным и гуморальным иммунитетом [9, 25, 31].

В течении развития инфекционного процесса внутриклеточный патоген *M. tuberculosis* может быть локализован и внеклеточно, например в верхних отделах респираторного тракта в начале заболевания или при разрушении гранулем, и доступен для специфических антител.

R. A. Brierley, G. R. Davis, G. C. Holtz [20], S. Guo [20] показали, что у контактных по туберкулезу Th1-ответ превалирует над Th2-ответом, при этом повышение активности Th2 у данной группы пациентов ассоциировано с высоким риском активации заболевания, при клиническом выздоровлении клеточное звено иммунного ответа вновь преобладает над гуморальным.

Антитела при туберкулезе играют важную роль в усилении иммунной защиты организма против *M. tuberculosis*. Они участвуют в нейтрализации токсинов (например, нейтрализуют токсический эффект корд-фактора), в реакциях опсонизации, активации комплемента по классическому пути, антитело-зависимой клеточной цитотоксичности, презентации антигена, способствуют фагосомально-лизосомальному слиянию, секреции провоспалительных цитокинов. Установлено, что антимикобактериальные антитела усиливают клеточный иммунитет против микобактерий, в том числе за счет стимулирования пролиферации CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток и выброса ими γ -ИНФ [9, 14]. Кроме того, противотуберкулезные антитела препятствуют адгезии бактерий к клеткам тканей хозяина. В частности, обработка фильтрата культуры *M. tuberculosis*, интраназально вводимого лабораторным мышам, антителами к поверхностному гликопротеину, участвующему в адгезии микобактерий к эпителиальным клеткам, позволила уменьшить обсемененность селезенки микобактериями [21]. Так, в ряде исследований было продемонстрировано, что введение иммунокомпетентным мышам (дефицитным по В-клеткам или с тяжелым комбинированным иммунодефицитом), инфицированным *M. tuberculosis* или *M. bovis*, моноклональных антител против некоторых антигенов *M. tuberculosis* (НВНА, 16 кДа белок, Ag85A, Ag85B, MPT83, ЛАМ), способствует снижению обсемененности тканей микобактериями и увеличению продолжительности жизни животных за счет уменьшения гранулематозного воспаления и некроза тканей [6, 17, 21, 27, 29].

Гуморальный иммунитет может играть большую роль в защите против туберкулеза, чем предполагалось ранее. Например, в легких у больных туберкулезом людей обнаруживаются фолликулоподобные агрегаты, состоящие из В-клеток, а у больных обезьян – даже активированные В-клетки. То есть В-клетки и специфические противотуберкулезные антитела могут принимать участие в развитии локального имму-

нитета в очаге инфекции и в стимуляции системного иммунитета в организме больного туберкулезом [18, 30].

В формировании гуморального иммунного ответа при туберкулезе наблюдается тенденция к нарастанию титра и повышению аффинности противотуберкулезных иммуноглобулинов (Ig) изотипов – G и A при усилении активности туберкулезного процесса. При развитии вторичного туберкулеза титр данных антител и их аффинность значительно увеличиваются в связи с активацией механизма иммунологической памяти [9].

Противотуберкулезные IgM антитела при активном туберкулезном процессе определяются редко. Вероятно, это связано с тем, что IgM синтезируются на ранних этапах развития инфекции, присутствуют в крови непродолжительное время и, как правило, в меньшей концентрации, чем IgG и IgA. Существует предположение о том, что IgM могут связывать широкий спектр антигенов с низкой аффинностью, а зрелые IgG, напротив, узкий круг антигенов, но с более высоким сродством к ним. Поэтому большинство исследований гуморального иммунитета при туберкулезе сосредоточено на определении антител класса G или A [9, 33].

Нами [9] было показано, что при туберкулезе повышен титр и антител класса IgE, однако они находятся в сыворотке крови в основном в связанном состоянии в составе циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК). После проведенного лечения антительный ответ на *M. tuberculosis*, как правило, угасает, однако противотуберкулезные антитела могут персистировать в крови еще некоторое время [30]. Так, установлено, что формируется угасание антительного ответа к белкам фильтрата культуры *M. tuberculosis* в течение 3 лет, а к белкам менее 20 кДа – в течение двух лет после начала химиотерапии [29, 30]. Чаще всего противотуберкулезные антитела обнаруживаются в сыворотке больных до 3 месяцев после начала лечения, однако уже через 9–12 месяцев они полностью исчезают [30].

Характер иммунного ответа при туберкулезе зависит от природы антигенов *M. tuberculosis* и их свойств. Например, гуморальный иммунный ответ формируется преимущественно на высокомолекулярные белки (38 кДа, 81 кДа, 309 кДа (Rv3347), а Т-клеточный ответ – на низкомолекулярные белки (ESAT-6, CFP-10, TB7.7) [16, 19].

Антителообразование при туберкулезе могут стимулировать и выявлять различные компоненты микобактерий: белки, липиды, полисахариды. Считается, что при определенных вариантах туберкулеза на гликолипидные антигены *M. tuberculosis* формируется более выраженный гуморальный ответ, чем на белковые антигены [30]. Липидные и полисахаридные антигены *M. tuberculosis* относятся к тимуснезависимым антигенам, которые презентуются незрелыми дендритными и В-клетками, тимоцитами TCR $\gamma\delta$ и TCR $\alpha\beta$ CD4-CD8⁻ Т-лимфоцитами, а также Т-клетками, натуральными киллерами (НКТ) в комплексе с молекулой CD1. При этом одни антигены, такие как ЛАМ и глюкоза мономиколат, презентуются

в комплексе с белками CD1 1-й группы (CD1a, CD1b, CD1c), а другие с CD1 2-й группы (CD1d). Активированные антигеном CD1-рестрицированные Т-клетки могут секретировать как Th2-цитокины (ИЛ-4, ИЛ-13), стимулирующие активацию В-клеток, так и непосредственно взаимодействовать с CD1/CD21 – экспрессирующими В-клетками маргинальной зоны селезенки, способствуя усилению антительного ответа на небелковые антигены [4, 16, 20, 31].

Повышенная экспрессия CD1 на незрелых дендритных клетках предполагает, что CD1-рестрицированные Т-клетки могут функционировать в более раннюю фазу иммунного ответа, чем главный комплекс гистосовместимости (ГКГС), а значит, CD1 – опосредованная презентация антигенов служит основанием для возможности детекции микобактериальной инфекции вне зависимости от состояния Т-клеточного иммунитета [31, 33].

В течение туберкулезного процесса происходит изменение спектра антигенов, синтезируемых микобактериями в зависимости от стадии и степени распространенности заболевания. Следовательно, и антитела к разным антигенам микобактерий имеют разную динамику [30].

Например, антитела к 16 кДа белку определяют еще в латентную фазу заболевания, а антитела к 38 кДа белку характерны для активного прогрессирующего туберкулезного процесса с деструктивным поражением тканей легких. Антитела к антигенам *M. tuberculosis* детектируют не только в сыворотке крови, но и в других биологических средах организма: в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ), плевральной, асцитической жидкостях и моче [22, 28].

Отсутствие противотуберкулезных антител в сыворотке больных туберкулезом может быть обусловлено включением этих антител в состав ЦИК. В ЦИК могут входить иммуноглобулины всех классов, присутствующих в повышенных титрах у больных туберкулезом (IgG, IgA, IgM, IgE), что может повлиять на эффективность серодиагностики при туберкулезе [9].

Гуморальный ответ на антигены *M. tuberculosis* при туберкулезе гетерогенен. В зависимости от этнических и индивидуальных генетических особенностей организма, стадии и формы туберкулеза, сопутствующих заболеваний, а также региона проживания пациента выраженность гуморального ответа на одни и те же антигены может быть различна [6, 16]. Прежде всего, гетерогенность гуморального иммунного ответа при туберкулезе обуславливают иммуногенетические различия больных туберкулезом. Например, полиморфизм системы человеческих лейкоцитарных антигенов (HLA) определяет различия в степени резистентности иммунной системы против туберкулеза. Так, установлено, что фенотип HLA-DR2 ассоциирован с повышенной восприимчивостью к туберкулезу и измененными антительным и клеточным ответами при легочном туберкулезе [5, 13].

Установлено, что наличие в генотипе у больного одного из трех вариантов сочетаний генов (HLA-DRB1*04

и HLA-DQB1*02, HLA-DRB1*16 и HLA-DQB1*03 (или HLA-DQB1*05)) предрасполагает к тяжелому прогрессирующему течению туберкулеза с доминированием гуморального иммунитета, а генотип только HLA-DQB1*03, напротив, ассоциирован с ограниченными формами туберкулеза и незначительным возрастанием титра противотуберкулезных антител в крови. Сниженная восприимчивость к туберкулезу обнаружена, например, у афроамериканцев с HLA-DR6 [10, 18]. Таким образом, при оценке гуморального иммунного ответа на антигены *M. tuberculosis* необходимо использовать сыворотки больных и здоровых доноров (в качестве отрицательных контролей) из одного региона.

Иммунный ответ на *M. tuberculosis* различается у пациентов разного пола и возраста. Например, установлено наличие повышенной восприимчивости к туберкулезу у лиц женского пола до, а у лиц мужского пола после полового созревания. Данные наблюдения в литературе объясняются возможной протективной ролью женских половых гормонов, однако истинная причина данного наблюдения пока не установлена [30].

Известно, что чувствительность серодиагностических проб на туберкулез у детей варьирует от 14 до 85%, а специфичность – от 86 до 100%. Широкая вариабельность данных значений обусловлена многими факторами. Так, точность диагностики зависит от возраста ребенка, времени проведения вакцинации против туберкулеза вакциной *Bacillus Calmette – Guérin* (BCG) (БЦЖ), формы туберкулеза, изотипа антител, определяемого в исследовании, способом определения значения «cutoff». Тем не менее многие авторы [15, 19] отмечают перспективы применения серодиагностики туберкулеза у детей, так как в сыворотках детей больных туберкулезом определяются повышенные, по сравнению со здоровыми детьми, титры антител против некоторых гликолипидных (PGL-Tb1, диацилтрегалоза (ДАТ)) и белковых (A60, 38 кДа, антигены комплекса Ag85) антигенов *M. tuberculosis*.

С возрастом реактивность специфического противотуберкулезного иммунитета (клеточного и гуморального) угасает. У лиц старше 60 лет выраженность реакции на туберкулин ниже, чем у лиц молодого и среднего возраста. Реактивность пробы Манту в 65–74 года падает с 50 до 10%, а старше 95 лет – до 5% [10].

Надо понимать, что особенности развития иммунного ответа связаны не только с состоянием иммунного гомеостаза, но и с вирулентностью *M. tuberculosis*. В настоящее время для изучения вирулентности штаммов *M. tuberculosis* используют макрофаги, которые позволяют количественно определить гибель загрязненных клеток. Штаммы *M. tuberculosis*, так же как и другие микроорганизмы могут отличаться по способности к адгезии, инвазии, адаптации к условиям макроорганизма, агрессии, продукции токсинов.

Один из основных генетических локусов вирулентности RD1 (Region of Difference 1) играет ключевую роль в патогенности микобактерий. Его делеция приводит к потере вирулентности, а внедрение в геном BCG, повышает вирулентность вакцинного штамма. Компоненты клеточной стенки, такие как «корд-фактор», липоарабиноманнан (LAM), фенольные гликолипиды, сульфатиды подавляют продукцию активных форм кислорода, синтез γ -ИФН. А LAM, кроме того, препятствует образованию фаголизосомы, пролиферации Т-лимфоцитов и способствует ингибированию активности макрофагов. Препятствует образованию фаголизосомы, а в итоге – развитию микробицидных эффектов со стороны макрофагов и фермент микобактерий – липидная фосфатаза (SapM). Вирулентные микобактерии имеют гомолог гена Rv0394c, который кодирует белок со свойствами гиалуронидазы и хондросульфатазы, способствующие инвазии и распространению микобактерий в макроорганизме, а у непатогенных микроорганизмов данный гомолог отсутствует [12, 15, 18, 20].

Другим важным аспектом является наличие гена MT2175 и гена, кодирующего белок SecA2, отсутствие которых снижает темп размножения и скорость роста микобактерий, то есть *M. tuberculosis* способны изменять темп размножения внутри хозяина в зависимости от сложившихся условий и оптимальной адаптации в организме хозяина. У микобактерий, в отличие от других бактерий, выделена система ESX, которая секретирует небольшие белковые молекулы вирулентности. В частности, ESAT-6, CFP10, которые считаются главными белковыми факторами вирулентности *M. tuberculosis*. Кодируют секрецию данных белков гены Rv3875 и Rv3874, находящиеся в локусе RD1. Эти белки инактивируют макрофаги, дендритные клетки, препятствуют слиянию фагосомы с лизосомальными гранулами. Секреция ESAT-6 микобактериями приводит к дестабилизации и лизису липосомы [17, 21, 26].

Таким образом, рассмотренные особенности вирулентности и иммунопатогенеза *M. tuberculosis* обуславливают естественные трудности диагностики туберкулезной инфекции.

Кожные пробы (Манту, «Диаскин-тест», проба с аллергеном туберкулезным рекомбинантным) хороши для скрининговой диагностики, но каждый имеет свои недостатки, снижающие их специфичность [24, 27].

Культуральная методика диагностики туберкулеза высокоспецифична, является «золотым стандартом диагностики», и помимо этого, она позволяет определять чувствительность возбудителя к антибиотикам. Однако эта методика требует длительного ожидания (занимает 4–12 недель, а окончательный ответ дается не ранее 8 недель), в части случаев оказывается безрезультатной и является небезопасной для здоровья медицинского персонала [29].

Полуавтоматизированная радиометрическая культуральная методика с использованием таких систем, как BACTEC TB-460, BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, Sparks, MD) и MB/BacT (Organon Teknica),

позволяет обнаружить возбудителя в более короткие сроки (10–20 дней), однако, достаточно дорога для повсеместного применения [34].

Рентгенологическое обследование неспецифично и не является экономически оправданной методикой скрининга населения на туберкулез. При сочетании туберкулеза с инфекцией вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-инфекцией) эта методика часто дает атипичную картину, и в 10–20% изменения на рентгенограмме остаются в пределах нормы [8].

Методики диагностики, основанные на ПЦР (Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct Test, Gen-Probe; Amplicor, Roche; ProbeTec ET, BD Becton Dickinson, Sparks, MD) имеют высокую специфичность. В то же время чувствительность их, как правило, невысокая, что обусловлено трудностями амплификации олигобациллярных образцов, влияния ингибиторов, присутствующих в образцах, на течение реакции и другими факторами. С помощью ПЦР сложно дифференцировать *M. tuberculosis* от других представителей комплекса *M. tuberculosis* из-за высокого сходства их геномов. Также применение этих методик ограничено относительно высокой стоимостью анализа, необходимостью наличия дорогостоящего оборудования и квалифицированных специалистов [8].

Поэтому в перспективе основными методиками лабораторной диагностики туберкулезной инфекции должны стать иммунологические. Для оптимизации туберкулезной инфекции необходимо рассмотреть наиболее эффективные серодиагностические маркеры туберкулеза при различных формах и стадиях заболевания. Во-первых, эти антигены должны быть специфичны для комплекса *M. tuberculosis*, во-вторых, специфические антитела против данных антигенов должны определяться при активном туберкулезном процессе в значительно более высоком титре, чем при латентной инфекции. В-третьих, сыворотки здоровых БЦЖ-вакцинированных людей, а также пациентов с ложноположительной реакцией на туберкулин должны проявлять минимальную реактивность в отношении выбранных антигенов. Важным критерием выбора антигенных препаратов является возможность выявления с помощью них случаев «мазок-негативного» легочного, внелегочного туберкулеза, а также туберкулеза у ВИЧ-инфицированных людей. Понятно, что такую идеальную картину диагностики туберкулеза практически сконструировать на современном уровне биотехнологии практически нереально, однако повысить диагностическую ценность исследования вполне можно.

Достаточно высокую диагностическую ценность имеют секретируемые белки MPT70, MPT64 и белки комплекса Ag85. Это было связано, прежде всего, с обнаружением этих антигенов в фильтрате культуры в большом количестве, а также с тем, что секретируемые белки стимулируют выраженную ответную реакцию иммунной системы. Среди внутриклеточных белков наибольшее значение имеют белки теплового шока, такие как HSP60, HSP70, HSPX. Среди мем-

бренных антигенов – это 19 и 38 кДа липопотеины, а также ЛАМ [6, 15]. После расшифровки генома *M. tuberculosis* в 1998 г. стало возможным изучение структуры и свойств многих неизвестных ранее антигенов. Методом сравнительной геномики идентифицировано несколько «регионов различий» (RD1–16) между *M. tuberculosis* H37Rv и *M. bovis* BCG [21]. Существующие данные свидетельствуют о том, что RD1 отсутствует также в геномах большинства нетуберкулезных микобактерий.

Для серодиагностики туберкулеза наиболее важно определение заболевания на начальных этапах активации туберкулезного процесса. Спектр синтезируемых антигенов *M. tuberculosis* и антителый ответ на них меняется в зависимости от стадии и формы заболевания. Так, например, повышенный титр анти-14 кДа антител ассоциирован с хронической формой заболевания в большей степени, чем с активным туберкулезным процессом, антитела к ESAT-6 определяются уже в латентном периоде заболевания, но их титр существенно нарастает при активации туберкулеза. Высокий уровень анти-32 кДа антител определяется на ранних стадиях прогрессирования заболевания до фазы распада и диссеминирования, а антител против 38 кДа белка – при активном прогрессирующем кавернозном туберкулезе легких [14, 18, 19].

Антитела изотипа IgG к корд-фактору (трегалоза-6,6-димиколат) были детектированы путем иммуноферментного анализа (ИФА) от 81 до 91,5% мазкопозитивных больных туберкулезом и только у 4% здоровых доноров [19].

Также были выявлены антитела и к 6 производным трегалозы у 91,5% из 924 госпитализированных и у 93,3% из 210 вновь выявленных туберкулезных больных [17]. При сравнении в ИФА серодиагностической эффективности четырех липидных антигенов *M. tuberculosis* (корд-фактора, ДАТ, ТАТ и SL I), наилучшие показатели чувствительности (81% при детекции IgG, 66% – IgA) и специфичности (77,6% – IgG и 87% – IgA) были получены для SL I [19].

Анти-PGL-Tb1 антитела класса А были выявлены у 88% больных (независимо от результатов бактериоскопии мазка мокроты) и ни у одного здорового пациента из контрольной группы, при этом в ходе лечения титры данных антител снижались [14]. Многие данные свидетельствуют о высокой эффективности серологических проб, основанных на гликолипидных антигенах *M. tuberculosis*, при выявлении туберкулеза у ВИЧ-инфицированных.

ИФА, детектирующий антитела к двум антигенам *M. tuberculosis*, ЛАМ и 38 кДа белку, показывает чувствительность до 71% при специфичности 100% [14, 16, 30].

Одним из способов усовершенствования серодиагностических проб, способствующих повышению чувствительности серодиагностики туберкулеза, является создание полиэпитопных химерных антигенов путем химической конъюгации белков с углеводными молекулами. Такой структурой могут быть олигоса-

харидные фрагменты арабиноманнана, выделенные из ЛАМ штамма *M. tuberculosis* H37Rv, ковалентно конъюгированные с белками фильтрата культуры *M. tuberculosis* штамма Harlingen (Ag85B и 75 кДа), а также с тетанус-токсином (в качестве контроля для углеводного компонента конъюгатов) [22, 27].

Также одним из путей повышения эффективности серодиагностики туберкулеза является создание композиций (коктейля) из нескольких иммунодоминантных антигенов *M. tuberculosis*. При включении в него антигенов *M. tuberculosis* только с высокой специфичностью можно достичь увеличения чувствительности диагностики при минимальном числе ложноположительных результатов. Таким вариантом может быть коктейль, включающий антигены Rv3425, ЛАМ и 38 кДа белок. Комбинация трех данных антигенов в одной пробе позволила повысить чувствительность серодиагностики с одним антигеном с 20,6–35,3 до 61,8% для легочного и внелегочного туберкулеза, специфичность при этом снизилась только на 3,5–7% [35]. В настоящее время рассматривается коктейль из 5 антигенов (Rv2031c, Rv2185c, Rv2537c, Rv2785c, Rv3354) со специфичностью 100% и чувствительностью 76%. Однако объединение различных антигенов в единый коктейль может повлиять на их стабильность в смеси и, следовательно, на эффективность взаимодействия со специфическими антителами. Возможным вариантом решения этой проблемы является создание гибридных белков, состоящих из наиболее иммуногенных белков *M. tuberculosis*, либо только из иммунодоминантных эпитопов этих белков [28].

Химерные белки, содержащие только высокоспецифичные пептиды иммунодоминантных белков *M. tuberculosis*, имеют перспективы стать лучшими серомаркерами туберкулеза [26, 28]. В недавнем исследовании с помощью 2 химерных белков, состоящих из 3 (38 кДа-ESAT6-CFP10) и 4 (Mtb8.4-MPT64-TB16.3-Mtb8) антигенов *M. tuberculosis* было выявлено более 85% случаев легочного и около 75% внелегочного туберкулеза (при специфичности 90%) [30].

Одним из вариантов генетической конъюгации микобактериальных антигенов является слитый белок Ag85B-ESAT-6, он включает в себя последовательности двух высокоиммуногенных секретируемых белков *M. tuberculosis*. Антиген Ag85B-ESAT-6 имеет перспективы для использования его в качестве вакцины у людей [6, 17].

В настоящее время на территории РФ разрешены к применению в клинической практике Министерства здравоохранения РФ несколько серологических проб на туберкулез: TB-Spot ver.2.0 (Span Diagnostics Ltd, Индия), iCHECK-TB (IND, Канада) и Иммунохром-анти-МТ-экспресс (общество с ограниченной ответственностью Прогрессивные биомедицинские технологии, Россия). TB-Spot ver.2.0 позволяет обнаруживать антитела к антигенам *M. tuberculosis* (ЛАМ и 38 кДа белку) в 80–85% случаев туберкулеза и имеет специфичность 95%. Другие две пробы основаны на определении антител к антигенному комплексу *M.*

tuberculosis A60 – их чувствительность составляет 70–80%, а специфичность – 80–100% среди различных групп туберкулезных больных на территории РФ [4, 13].

На основании вышеизложенного можно сделать заключение, что серодиагностика является перспективной методикой для выявления туберкулеза, однако для утверждения ее в качестве стандарта необходимо значительное повышение чувствительности и специфичности существующих серологических проб. Наибольшей эффективностью для обнаружения туберкулеза будут обладать серопробы, основанные на мультиантигенных композициях, включающих иммунодоминантные белковые и гликолипидные антигены *M. tuberculosis*.

Иммунодиагностика предоставляет новые возможности для улучшения диагностики туберкулеза. Она позволяет обнаружить активный туберкулезный процесс в организме на основании иммунологических признаков инфекции. Иммунодиагностика имеет перспективы для выявления туберкулеза в короткие сроки вне зависимости от локализации инфекции и формы заболевания.

Литература

- Беспярых, Ю.А. Геномная и протеомная характеристика штаммов *Mycobacterium tuberculosis* кластера Beijing ВО/W148: дис. ... канд. биол. наук / Ю.А. Беспярых. – М.: НИИБМХ им. В.Н. Ореховича РАМН. – 2016. – 377 с.
- Василенко, Н.В. Современные взгляды на генетические семейства *M. tuberculosis* / Н.В. Василенко, А.М. Будрицкий // Вестн. ВГМУ. – 2014. – Т. 13, № 5. – С. 16–22.
- Васильева, Н.Р. Генотипы штаммов *Mycobacterium tuberculosis* с широкой лекарственной устойчивостью и клинико-эпидемиологические особенности туберкулеза легких / Н.Р. Васильева [и др.] // Инфекция и иммунитет. – 2016. – Т. 6, № 2. – С. 179–183.
- Жердев, А.В. Сравнительная характеристика рекомбинантных белков *Mycobacterium tuberculosis* в серодиагностике туберкулеза / А.В. Жердев [и др.] // Физиол. и патол. иммунной системы. – 2006. – Т. 9. – С. 3–8.
- Капков, Л.П. Значение показателей резервуара бациллярных больных туберкулезом органов дыхания в оценке эпидемической ситуации по туберкулезу / Л.П. Капков // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2007. – № 1. – С. 17–22.
- Кравченко, Т.Б. Клонирование и экспрессия протективных антигенов *Mycobacterium tuberculosis* Ag85 и ESAT-6 в клетках *Francisella tularensis* 15/10 / Т. Б. Кравченко [и др.] // Биохимия. – 2007. – Т. 72, № 7. – С. 905–914.
- Мокроусов, И.В. Высокоразрешающее типирование штаммов генотипа Beijing российской популяции *Mycobacterium tuberculosis* / И.В. Мокроусов, Д.А. Старкова, О.В. Нарвская // Туберкулез и болезни легких. – № 7. – С. 46–53.
- Москалев, А.В. Проблемы скрининговой диагностики туберкулезной инфекции / А.В. Москалев, В.Б. Сбойчаков, М.Н. Павлов // Мат. Всеросс. научн. о-практ. конф. «Микробиология: от микроскопа до геномного анализа», 17–18 мая 2018. – СПб., 2018. – С. 77–80.
- Москалев, А.В. Общая иммунология с основами клинической иммунологии / А.В. Москалев, В.Б. Сбойчаков, А.С. Рудой. – М.: Гэотар, 2015. – 351 с.
- Нарвская, О.В. Геномный полиморфизм *Mycobacterium tuberculosis* и его значение в эпидемическом процессе: автореф. дис. ... д-ра мед. наук / О. В. Нарвская. – СПб.: СПб НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, 2003. – 35 с.
- Пасечник, О.А. Генетическое разнообразие лекарственно-устойчивых штаммов *Mycobacterium tuberculosis* в Омской области / О.А. Пасечник [и др.] // Туберкулез и болезни легких. – 2017. – Т. 95, № 7. – С. 33–39.
- Подвальный, Н.М. Циклизация 1,2-(метил) ортобензоата Р-Д-арабинофуранозы с помощью бромида магния / Н.М. Подвальный [и др.] // Известия академии наук. Серия химическая. – 2009. – № 3. – С. 472–473.
- Салина, Т.Ю. Распространенность, региональные особенности генетической структуры и лекарственная устойчивость микобактерий туберкулеза семейства Haarlem среди больных туберкулезом Саратовской области / Т.Ю. Салина, Т.И. Морозова // Туберкулез и болезни легких. – 2017. – Т. 95, № 5. – С. 60–64.
- Abebe, F. The protective role of antibody responses during *Mycobacterium tuberculosis* infection / F. Abebe, G. Bjune // Clinical and experimental immunology. – 2009. – Vol. 157, № 2. – P. 235–243.
- Abronina, P.I. Formation of orthoester-linked D-arabinofuranose oligosaccharides and their isomerization into the corresponding glycosides / P.I. Abronina [et al.] // Tetrahedron Lett. – 2011. – Vol. 52. – P. 1794–1796.
- Achkar, J.M. Antibody responses to mycobacterial antigens in children with tuberculosis: challenges and potential diagnostic value / J.M. Achkar, A. Ziegenbalg // Clinical and Vaccine Immunology. – 2012. – Vol. 19, № 12. – P. 1898–1906.
- Achkar, J.M. *Mycobacterium tuberculosis* malate synthase - and MPT51-based serodiagnostic assay as an adjunct to rapid identification of pulmonary tuberculosis / J. M. Achkar [et al.] // Clinical and Vaccine Immunology. – 2006. – Vol. 113. – P. 1291–1293.
- Bezerra, J.M. A Study of IgA antibody response to different *Mycobacterium tuberculosis* antigens in the diagnosis and monitoring of pulmonary tuberculosis / J. M. Bezerra [et al.] // The Brazilian journal of infectious diseases. – 2009. – Vol. 13, № 1. – P. 53–58.
- Boehme, C. Detection of mycobacterial lipoarabinomannan with an antigen-capture ELISA in unprocessed urine of Tanzanian patients with suspected tuberculosis / C. Boehme [et al.] // Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. – 2005. – Vol. 99, № 12. – P. 893–900.
- Brierley, R.A. Production of insulin-like growth factor-1 in methylotrophic yeast cells / R.A. Brierley, G.R. Davis, G.C. Holtz // United States Patent 5324639–1994.
- Brusasca, P.N. Immunological characterization of antigens encoded by the RD1 region of the *Mycobacterium tuberculosis* genome / P.N. Brusasca [et al.] // Scand. J. Immunol. – 2001. – Vol. 54. – P. 448–452.
- Daley, P. Blinded evaluation of commercial urinary lipoarabinomannan for active tuberculosis: a pilot study / P. Daley [et al.] // The international journal of tuberculosis and lung disease. – 2009. – Vol. 13, № 8. – P. 989–995.
- Desikan, P. Sputum smear microscopy in tuberculosis: Is it still relevant? / P. Desikan // Indian. J. Med. Res. – 2013. – Vol. 137, № 3. – P. 442–444.
- Felber, A. Weakly positive tests and chronologic variation of the QuantiFERON assay: A retrospective appraisal of usefulness / A. Felber, W. Graninger // Tuberculosis. – 2013. – Vol. 93, № 6. – P. 647–653.
- Feng, X. Enhanced serodiagnostic utility of novel *Mycobacterium tuberculosis* polyproteins / X. Feng [et al.] // J. Infect. – 2013. – Vol. 66, № 4. – P. 366–375.
- Guo, S. The CFP10/ESAT6 complex of *Mycobacterium tuberculosis* may function as a regulator of macrophage cell death at different stages of tuberculosis infection / S. Guo [et al.] // Med. hypotheses. – 2012. – Vol. 78, № 3. – P. 389–392.
- He, X.Y. Assessment of five antigens from *Mycobacterium tuberculosis* for serodiagnosis of tuberculosis / X.Y. He [et al.] // Clinical and vaccine immunology. – 2011. – Vol. 18, № 4. – P. 565–570.

28. Kashyap, R. S. Diagnosis of tuberculosis infection based on synthetic peptides from Mycobacterium tuberculosis antigen 85 complex / R.S. Kashyap [et al.] // Clin. Neurol. Neurosurg. – 2013. – Vol. 115, № 6. – P. 678–683.
29. Kumar, G. Whole cell & culture filtrate proteins from prevalent genotypes of Mycobacterium tuberculosis provoke better antibody & T cell – 2012. – Vol. 135. – P. 745–755.
30. Kunnath-Velayudhan, S. Dynamic antibody responses to the Mycobacterium tuberculosis proteome / S. Kunnath-Velayudhan [et al.] // PNAS. – 2010. – Vol. 107, № 33. – P. 14703–14708.
31. Maglione, P.J. How B cells shape the immune response against Mycobacterium tuberculosis / P.J. Maglione, J. Chan // Eur. J. Immunol. – 2009. – Vol. 39. – P. 676–686.
32. Manivannan, S. Role of complement activation and antibody in the interaction between Mycobacterium tuberculosis and human macrophages / S. Manivannan, V.N. Rao, V.D. Ramanathan // Indian. J. Exp. Biol. – 2012. – Vol. 50, № 8. – P. 542–550.
33. Phuah, J.Y. Activated B cells in the granulomas of nonhuman primates infected with Mycobacterium tuberculosis / J.Y. Phuah [et al.] // Am. J. Pathol. – 2012. – Vol. 181. – P. 508–514.
34. Planatscher, H. Systematic reference sample generation for multiplexed serological assays / H. Planatscher [et al.] // Scientific reports. – 2013. – Vol. 3, № 3259. – P. 1–5.
35. Raqib, R. Detection of antibodies secreted from circulating Mycobacterium tuberculosis-specific plasma cells in the diagnosis of pediatric tuberculosis / R. Raqib [et al.] // Clinical and vaccine immunology. – 2009. – Vol. 16, № 4. – P. 521–527.

A.V. Moskalev, V.B. Sboychakov, A.V. Apchel, V.N. Cygan

The modern characteristic of biology and diagnostics prospect *M. tuberculosis*

Abstract. Features of biology *M. tuberculosis* are considered the including modern data about features of morphology, the antigen structures of the various nature defining virulence of activators of tuberculosis. Based on the method data spoligohipirovanie genetic distinctions of families Mycobacteriaceae, and among them strains genotype Beijing, different by wide prevalence in the Russian Federation and high medicinal stability are especially characterised. Based on difficult antigens structure *M. tuberculosis* features of the development of the immune answer which allow predicting a current of the infectious process are reflected. The presented characteristics reflect considerable heterogeneity strains *M. tuberculosis* which is combined with a variety of an immune homeostasis of the carriers which were ill and by that essentially complicates laboratory diagnostics of tuberculosis. Among the considered modern methods of diagnostics of a tubercular infection, the most perspective can be immunologic. One of the ways of improvement serodiagnostic the tests promoting an increase of sensitivity serodiagnostic of tuberculosis is creation polyepitopes chimeric antigens by chemical synapsis fibres with carbohydrate molecules. Creation of a composition from several immunodominant antigens *M. tuberculosis* can become other direction of increase of sensitivity. that will allow lowering considerably number false-positive results. Creation of hybrid fibers will allow avoiding an inevitable decrease in affinity of antibodies of the way of the blood, arising at the use of several antigens simultaneously.

Key words: mycobacteria, family, strains, identity, antibodies, antigens, mycolic acids, immunodiagnostics, genes, genotype, genetic line.

Контактный телефон: 8-921-989-17-42; e-mail: vmeda-nio@mil.ru