

Исследование протективной активности рекомбинантных антигенов возбудителя туберкулеза на мышах

И. В. Красильников, д.б.н., проф., зам. директора¹

С. А. Аракелов, к.б.н., советник директора¹

С. В. Петровский, первый зам. директора¹

Т. И. Виноградова, д.м.н., проф., главный научный сотрудник²

Н. В. Заболотных, д.м.н., ведущий научный сотрудник²

¹ФГУП «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» ФМБА России, г. Санкт-Петербург
²ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

Study of protective activity of recombinant tuberculosis pathogen antigens in mice

I. V. Krasilnikov, S. A. Arakelov, S. V. Petrovsky, T. I. Vinogradova, N. V. Zabolotnykh

Saint Petersburg Research Institute of Vaccines and Sera and Enterprise for Production of Bacterial Preparations, Saint Petersburg State Research Institute of Phthisiopulmonology; Saint Petersburg, Russia

Резюме

Статья посвящена анализу современной ситуации по разработке новых вакцин против туберкулеза. Недостатки традиционной вакцины БЦЖ общеизвестны. Низкая эффективность и сравнительно высокая реактогенность этой вакцины привели к отмене БЦЖ в некоторых высокоразвитых странах с низкой заболеваемостью. Большинство разработанных новых вакцин содержат в своем составе белки-антигены ESAT-6 и CFP-10, изучению иммунологических свойств которых и посвящена настоящая статья.

Ключевые слова: туберкулез, БЦЖ, вакцины, антигены, мышиная модель туберкулеза, иммуногенность.

Summary

The article is devoted to the analysis of the current situation on the development of new vaccines against tuberculosis. The shortcomings of the traditional BCG vaccine are well known. The low efficacy and relatively high reactogenicity of this vaccine led to the abolition of BCG in some highly developed countries with low incidence. Most of the new vaccines developed contain ESAT-6 and CFP-10 antigen proteins, whose immunological properties are discussed in this paper.

Key words: tuberculosis, BCG, vaccines, antigens, murine model of tuberculosis, immunogenicity.

Туберкулез (ТБ) — одна из наиболее распространенных и опасных инфекций для человечества. Более 30 % населения планеты являются носителями туберкулезной бациллы (палочки Коха).

Эта внутриклеточная инфекция трудно поддается лечению вследствие множественной устойчивости к антибиотикам и высокой изменчивости самой бактерии [1, 2].

Одним из наиболее эффективных способов снижения заболеваемости ТБ считается вакцинопрофилактика, однако до настоящего времени единственной вакциной, разрешенной в практике здравоохранения, является БЦЖ.

Живая аттенуированная вакцина БЦЖ (BCG) применяется более 100 лет, получена многократным паспорированием штамма *M. bovis* и не со-

держит участок генома *RD 1*, который кодирует вирулентные антигены (белки) ESAT-6 и CFP-10. Исследования эффективности БЦЖ, проведенные во многих странах, показали, что вакцина частично защищает детей от инфекции и от серьезных осложнений, вызываемых ТБ в этой возрастной группе. Однако вакцина не безопасна для детей с иммунодефицитом и может индуцировать диссеминированную инфекцию с частотой 400 случаев на 100 тысяч вакцинированных. БЦЖ также обладает повышенной реактогенностью [3, 4].

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) запретила применять БЦЖ для вакцинации ВИЧ-позитивных детей. Вот почему одним из приоритетных направлений ВОЗ является разработка более безопасной и эффективной вакцины против ТБ [5–8].

В настоящее время разработаны около 20 кандидатных ТБ-вакцин, прошедших доклинические исследования и находящихся на разных этапах клинических испытаний [8–10], причем две из них разработаны в России [11–14].

В основном кандидатные вакцины можно объединить в две группы.

Первая — вакцины, представляющие собой усовершенствованную модифицированную БЦЖ, содержащую дополнительные сегменты в геноме, способные усилить клеточный иммунный ответ у вакцинируемых.

Вторая — рекомбинантные вакцины, содержащие набор протективных белков *M. tuberculosis*, таких как ESAT-6, Ag 85 A, Ag 85 B, Rv 2608 и др.

В составе большинства кандидатных вакцин содержится белок ESAT-6 (Rv 3875), который является основ-

ным белком в современных диагностических системах для выявления туберкулеза (IGRA, t-spot, ДСТ). Причем в случае применения набора ДСТ этот белок вводится подкожно (подобно пробе Манту) и может выполнять роль вакцинного антигена [15–19].

Изучение его иммуногенных свойств является важным аспектом как для разработки вакцин, так и для диагностики туберкулеза.

В настоящем исследовании представлены результаты по определению протективных свойств белка ESAT-6 / CFP-10 при моделировании мышино-го туберкулеза (модель разработана в Санкт-Петербургском научно-исследовательском институте фтизиопульмонологии Минздрава России).

1. Материалы и методы исследования

Исследуемый рекомбинантный белок ESAT-6 / CFP-10 (Rag) был выделен и очищен из штамма-продуцента *E. coli* с последующей лиофилизацией и любезно предоставлен В.Г. Луниным [14].

Непосредственно перед опытами на животных Rag растворяли в физиологическом буферном растворе (0,05 М), содержащем 0,15 М NaCl (рН 7,5) до конечной концентрации 100 мкг/мл. В опытах для иммунизации мышей использовали непосредственно Rag в буфере с концентрацией 100 мкг/мл (препарат 1), а также Rag с корпускулярным адьювантом (КА) на основе бетулина [20]. Содержание КА в препарате составляло 250 мкг/мл, а Rag — 100 мкг/мл (препарат 2).

Оценку результативности вакцинных кандидатов в условиях профилактики экспериментального генерализованного туберкулеза проводили на 54 половозрелых мышах-самцах линии C57black/6 с исходной массой тела 16–18 г. Животные поступили из филиала «Столбовая» Научного центра биомедицинских технологий ФМБА (Московская область).

Карантин. Длительность карантина (акклиматизационного периода) для всех животных составляла 14 дней. Во время карантина проводили ежедневный осмотр каждого животного, регистрировали поведение и общее

состояние. Перед началом исследования животных, отвечающих критериям включения в исследование, распределяли на группы. Животных, не соответствующих критериям включения в исследование, исключали из работы в период карантина.

Условия содержания. Клетки размещали в отдельные комнаты. Световой режим: 12 часов света, 12 часов темноты. Температура поддерживалась в пределах 23–25 °С, относительная влажность — 50–70 %. Воздухообмен поддерживался с помощью приточно-вытяжной вентиляции, стерилизация воздуха осуществлялась ежедневно путем кварцевания. Пищевой рацион соответствовал приказу Минздрава СССР «Нормативы затрат кормов для лабораторных животных» № 1179 от 10 октября 1983 года.

Методы исследования

Мышей вакцинировали вакцинными кандидатами препарат 1 и препарат 2 подкожно однократно либо двукратно (по схеме, приведенной в описании групп мышей) в дозе 0,1 мл на мыш. Через три недели после второй иммунизации у мышей моделировали генерализованный туберкулез введением в боковую хвостовую вену взвеси стандартизованной трехнедельной вирулентной культуры *M. tuberculosis H37 Rv* (10^6 КОЕ на мыш в 0,2 мл физиологического раствора), полученной из Научного центра экспертизы средств медицинского применения Минздрава России. Оценка результативности профилактической вакцинации проводилась через четыре недели после заражения. Контролем служили невакцинированные зараженные мыши, группой сравнения — животные, иммунизированные стандартной вакциной БЦЖ в дозе 5×10^5 БОЕ на мыш подкожно однократно.

Ниже приведена схема опыта с указанием контрольных групп и режимами введения исследуемых вакцинных препаратов.

1. Невакцинированные мыши зараженные *M. tuberculosis H37Rv* (контроль заражения) — 18 особей.

2. Мыши, вакцинированные БЦЖ (подкожно, однократно) и зараженные *M. tuberculosis H37Rv* — 12 особей.
3. Мыши, вакцинированные препаратом 1 К2 (подкожно, двукратно с интервалом три недели) и зараженные *M. tuberculosis H37Rv* через три недели после второй вакцинации — 12 особей.
4. Мыши, вакцинированные препаратом 2 (подкожно двукратно с интервалом три недели) и зараженные *M. tuberculosis H37Rv* через три недели после второй вакцинации — 12 особей.

Оценка результативности вакцинных кандидатов проводилась по следующим показателям:

- динамика гибели мышей;
- биометрические показатели легких и селезенки;
- макроскопическая оценка легких (индекс поражения);
- высеваемость МБТ из легких.

Динамика гибели выражалась в процентах к исходному числу животных.

Биометрические показатели. Коэффициенты массы (КМ) легких и селезенки определяли по формуле
$$KM = \frac{\text{масса органа (г)} \times 100}{\text{масса тела животного (г)}}$$

Индекс поражения легких определяли по совокупности экссудативных и продуктивных изменений в условных единицах — баллах (А.Е. Александрова, Б.М. Ариэль; 1993).

Экссудативные изменения:

- легкие воздушны — 0;
- единичные безвоздушные очаги — 0,25;
- легкие безвоздушны на 1/2 — 0,5;
- легкие безвоздушны на 2/3 — 0,75;
- легкие безвоздушны на всем протяжении — 1,0.

Продуктивные очаги:

- единичные субмилиарные очаги — 0,5;
- многочисленные (не более 20) — 1,0;
- многочисленные субмилиарные (более 20) — 1,5;
- единичные милиарные — 1,75;
- многочисленные сливающиеся субмилиарные и единичные милиарные — 2,0;

Таблица 1
Показатели тяжести течения туберкулезной инфекции у мышей C 57black/6, профилактически иммунизированных БЦЖ и исследуемыми вакцинными кандидатами, через четыре недели после инфицирования M. tuberculosis H37Rv

№ гр.	Условия опыта	Летальность, %	Коэффициент массы легких, у.е.	Коэффициент массы селезенки	Индекс поражения легких (усл. ед.)
1.	Контроль заражения, n = 18	33,3	3,21 ± 0,09	2,88 ± 0,26	3,02 ± 0,02
2.	БЦЖ однократно, n = 12	0	2,20 ± 0,12 p1-2 < 0,001	1,83 ± 0,10 p1-2 < 0,001	2,04 ± 0,05 p1,2 < 0,001
3.	Препарат 1 двукратно, n = 12	16,6	3,25 ± 0,17	2,39 ± 0,11	2,65 ± 0,08 p1,4 < 0,001
4.	Препарат 2 двукратно, n = 12	0	2,28 ± 0,11 p1-7 < 0,001	2,38 ± 0,12	2,27 ± 0,05 p1,7 < 0,001

Таблица 2
Высеваемость МБТ из легких у мышей C 57black/6, профилактически иммунизированных БЦЖ и исследуемыми вакцинными кандидатами, через четыре недели после инфицирования M. tuberculosis H37Rv

№ гр.	Условия опыта	Ig числа жизнеспособных бактерий в легких	Индекс защиты, Ig
1.	Контроль заражения, n = 6	5,19 ± 0,03	
2.	БЦЖ, n = 6	4,61 ± 0,02 p1-2 < 0,001	+0,58
4.	Препарат 1 двукратно, n = 6	5,09 ± 0,06	+0,10
7.	Препарат 2 двукратно, n = 6	4,77 ± 0,05 p1-7 < 0,001	+0,42

- многочисленные милиарные (не более 10) — 2,25;
- многочисленные милиарные, сливающиеся — 2,75;
- появление мелких казеозных некротических фокусов — 3,0;
- обширный казеоз — 4,0;
- сплошное поражение легких — 5,0.

При бактериологическом исследовании легких осуществляли дозированный посев гомогената ткани органа на плотную яичную среду Левенштейна-Йенсена методом серийных разведений. Нижняя граница чувствительности метода — 2×10^3 КОЕ. Массивность роста МБТ выражали в десятичных $\log$ (lg) от числа КОЕ. Расчет индекса защиты органа проводился при вычитании lg КОЕ иммунизированных мышей из lg КОЕ мышей группы контроля заражения. При оценке результатов положительным эффектом по задержке роста МБТ считается индекс защиты $\geq 0,5$ lg.

Для гистологического изучения легкие фиксировали в 10-процентном формалине, заливали в целлоидин-парафин-масло, срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

Методы статистического анализа результатов

Статистическая обработка данных проводилась с использованием параметрического теста Стьюдента.

2. Исследование эффективности вакцинных кандидатов в условиях профилактики экспериментального генерализованного туберкулеза у мышей

На момент окончания эксперимента через четыре недели после инфицирования *M. tuberculosis* H37Rv у невакцинированных мышей зарегистрирован распространенный туберкулезный процесс с преимущественным поражением легких.

У мышей, профилактически иммунизированных стандартной вакциной БЦЖ, при сравнении с зараженными невакцинированными животными отмечена существенная задержка развития инфекции [табл. 1, 2].

Так, если в группе контроля заражения, где исходное число мышей составляло 18 особей, к моменту окончания опыта погибли шесть мышей (33,3 %), то при вакцинации БЦЖ не погибло ни одного животного.

Остальные три показателя тяжести течения инфекции у мышей, леченных БЦЖ, также были значимо более низкими. Коэффициент массы легких при введении БЦЖ был ниже, чем в контроле заражения в 1,5 раза и составил $2,2 \pm 0,12$ против $3,21 \pm 0,09$ у.е. ($p < 0,001$), коэффициент массы селезенки — в 1,5 раза ($1,83 \pm 0,10$ против $2,88 \pm 0,26$ у.е.; $p < 0,001$), а индекс поражения легких — в 1,5 раза ($2,04 \pm 0,05$ против $3,02 \pm 0,06$ у.е.; $p < 0,001$).

Достоверно более низкой под действием БЦЖ оказалась и обсемененность легких МБТ, которая является интегральным показателем тяжести течения инфекции и протективного эффекта вакцинации (табл. 2).

Из табл. 2 видно, что при вакцинации БЦЖ индекс защиты легких (разница между lg числа жизнеспособных бактерий в легких невакцинированных и вакцинированных мышей) составил +0,58 lg, что свидетельствует о протективном действии вакцины, поскольку положительным эффектом по задержке роста МБТ считается индекс защиты $\geq 0,5$ lg.

Действие исследуемых вакцинных кандидатов на течение инфекции было менее существенным.

Наиболее близким к действию БЦЖ по задержке развития экспериментального туберкулеза был эффект препарата 2, при вакцинации которым, как и при использовании БЦЖ, не отмечено гибели мышей (табл. 1). Кроме того, при иммунизации препаратом 2 зарегистрирован достоверно более низкий коэффициент массы легких (в 1,4 раза, $2,280 \pm 0,121$ против $3,21 \pm 0,09$ у.е. в контуре заражения; $p < 0,001$) и индекс поражения легких (в 1,3 раза, $2,27 \pm 0,05$ против $3,02 \pm 0,06$ у.е.; $p < 0,001$). Значимо ниже

Таблица 3

Распространенность специфического поражения у мышей С 57black/6, профилактически иммунизированных БЦЖ и исследуемыми вакцинными кандидатами, через четыре недели после инфицирования *M. tuberculosis* H37Rv

№ гр.	Условия опыта	Снижение (более чем на 30%) воздушности легочной ткани	Небольшие участки инфильтрации	Крупные гранулемы	Отдельные небольшие гранулемы
1.	Контроль заражения, n = 6	5	2	4	0
2.	БЦЖ, n = 6	1	5	0	6
3.	Препарат 1 двукратно, n = 6	3	3	2	5
4.	Препарат 2 двукратно, n = 6	1	5	0	6

под влиянием препарата 2 по сравнению с невакцинированными мышами была и высеваемость МБТ из легких ($4,77 \pm 0,05$ lg числа жизнеспособных бактерий в легких против $5,19 \pm 0,03$ lg в контроле заражения; $p < 0,001$). Однако поскольку индекс защиты легких составил только $+0,42$ lg, сделать вывод о протективном действии кандидата по задержке роста МБТ в данном эксперименте представляется некорректным.

Вакцинация препаратом 1 слабее отразилась на сроках развития и тяжести течения инфекции. Под его влиянием отмечена несколько более низкая летальность (16,6 против 33,3 % в группе контроля заражения) и значимо более низкий индекс поражения легких, фиксирующий макроскопически определяемые очаги специфического воспаления. Достоверное снижение роста МБТ из легких при сравнении с невакцинированными мышами отмечено при иммунизации препаратом 1, индекс защиты легких при этом был совсем низким ($+0,1$ lg).

При гистологическом исследовании в легочной ткани зараженных невакцинированных мышей (контроль заражения) зарегистрировано большое количество свежих сливных инфильтративных очагов специфического воспаления с размытыми границами без четкой пространственной ориентации клеток, в большинстве случаев (в 5 из 6; 83,3 %) снижавших воздушность легочной ткани более чем на 30 % площади срезов (табл. 3). Альвеолы и межальвеолярные перегородки у этих животных были инфильтрированы клетками лимфоцитарно-макрофагального ряда на фоне серозной и фибринозной экссудации. Во всех случаях (100 %) обнаружены скопления нейтрофильных

лейкоцитов — маркеров альтерации, в четырех срезах (66,7 %) зарегистрированы скопления распадающихся нейтрофильных гранулоцитов — ядерный детрит (табл. 4), а в двух (33,3 %) — участки казеозного некроза С 57black/6 через четыре недели после инфицирования *M. tuberculosis* H37Rv. Определяются лимфоциты, макрофаги, эпителиоидные клетки и скопления распадающихся нейтрофильных гранулоцитов. Окраска гематоксилином и эозином 600×.

Периваскулярная и перибронхиальная инфильтрация выражена слабо, крупные лимфогистиоцитарные инфильтраты не обнаружены.

При вакцинации БЦЖ распространенность специфического воспаления в легочной ткани была значительно меньшей, чем в группе контроля заражения. Снижение воздушности легочной ткани более чем на 30 % площади срезов у этой группы мышей отмечено только в 1 из 6 случаев (16,7%) против 5 из 6 у животных контроля заражения. Специфическая инфильтрация при этом потеряла сливной характер, и у большинства мышей (в 5 из 6 случаев; 83,3 %) была представлена отдельными небольшими очагами инфильтрации (табл. 3).

Клеточный состав инфильтратов при вакцинации БЦЖ был представлен лимфоцитами, макрофагами и эпителиоидными клетками. В 2 из 6 случаях (33,3 против 100 % в контроле заражения) в очагах инфильтрации обнаружены единичные нейтрофильные лейкоциты, а в одном из них и их скопления (табл. 4). При этом участков ядерного детрита и казеозного некроза не зафиксировано. Эти данные свидетельствуют об отчетливой задержке при иммунизации БЦЖ развития альтеративного компонента воспаления.

Вакцинация БЦЖ отразилась и на характере гранул, обнаруженных во всех шести срезах (табл. 3, 5). Только в двух из них (33,3 %) отмечены преимущественно эпителиоидно-клеточные гранулемы с крупными скоплениями эпителиоидных клеток, тогда как у невакцинированных животных они зарегистрированы во всех срезах, где были найдены гранулемы. В большинстве гранул у мышей, вакцинированных БЦЖ, лимфоциты были концентрически расположены вокруг единичных эпителиоидных клеток. Эти изменения указывают на меньшую выраженность у вакцинированных БЦЖ мышей экссудативного компонента воспалительной реакции и соответственно большую — продуктивного, за который ответственные клетки лимфоидного ряда.

Как и по показателям тяжести течения инфекции, наиболее близким к действию БЦЖ при гистопатологическом исследовании был эффект препарата 2. При его использовании, причем в том же проценте случаев, как и при вакцинации БЦЖ, ткань легких в большинстве случаев была более воздушной, а очаги специфической инфильтрации — небольшими и несливными (83,3 %; табл. 3).

Инфильтраты в этой группе мышей, как и при использовании стандартной вакцины, состояли из лимфоцитов, макрофагов и эпителиоидных клеток, в трех случаях (50 %) в них обнаружены единичные нейтрофильные лейкоциты, а в одном срезе — и их скопления (табл. 4), то есть и по частоте регистрации признаков альтерации действие кандидата К4 практически не отличалось от эффекта БЦЖ.

Во всех срезах, так же как при иммунизации БЦЖ, имелись специфические гранулемы. При этом преимущественно эпителиоидно-клеточные

Таблица 4

Особенности клеточного состава участков инфильтрации у мышей C 57black/6, профилактически иммунизированных БЦЖ и исследуемыми вакцинными кандидатами, через четыре недели после инфицирования M. tuberculosis H37Rv

№ гр.	Условия опыта	Скопление эпителиоидных клеток	Единичные нейтрофильные гранулоциты	Скопление нейтрофильных гранулоцитов	Ядерный детрит	Участки некроза
1.	Контроль заражения, n = 6	6	6	6	4	2
2.	БЦЖ, n = 6	6	2	1	0	0
4.	Препарат 1 двукратно, n = 6	6	6	2	1	0
7.	Препарат 2 двукратно, n = 6	6	3	1	0	0

Таблица 5

Выраженность признаков напряженности местного иммунитета легочной ткани у мышей C 57black/6, профилактически иммунизированных БЦЖ и исследуемыми вакцинными кандидатами, через четыре недели после инфицирования M. tuberculosis H37Rv

№ гр.	Условия опыта	Эпителиоидно-клеточные гранулемы		Крупные периваскулярные лимфогистиоцитарные инфильтраты	Крупные перибронхиальные лимфогистиоцитарные инфильтраты
		Преимущественно эпителиоидные	С единичными эпителиоидными клетками		
1.	Контроль заражения, n = 6	4	0	0	0
2.	БЦЖ, n = 6	2	5	5	2
3.	Препарат 1 двукратно, n = 6	2	5	4	2
4.	Препарат 2 двукратно, n = 6	1	6	6	3

гранулемы в легких мышей, вакцинированных препаратом 2, обнаружены только в 1 из 6 случаев (16,7 при 33,3% у мышей группы 2), а гранулемы с единичными эпителиоидными клетками — во всех срезах.

Несколько чаще, чем в группе 2, регистрировались при вакцинации препаратом 2 крупные периваскулярные и перибронхиальные лимфогистиоцитарные инфильтраты (в 6 из 6 и в 3 из 6 случаев соответственно), что с учетом немного большей, чем при вакцинации БЦЖ, частоты регистрации гранулем с единичными эпителиоидными клетками позволяет предположить о несколько большей выраженности при иммунизации препаратом 2 стимуляции лимфоидного компонента воспалительной реакции в легких.

Вакцинация препаратом 1 слабее отразилась на распространенности специфического воспаления в легких и признаках альтерации.

У мышей, вакцинированных препаратом 1, по сравнению с контролем заражения очагов инфильтрации было меньше, они реже были сливными и меньше снижали воздушность легочной ткани (табл. 3). В то же время по этим же показателям распространенность специфических очагов при иммунизации мышей препаратом 1 была большей, чем при вакцинации БЦЖ и препаратом 2.

При оценке клеточного состава инфильтратов в препарате 1 маркеры

альтерации (нейтрофильные лейкоциты, их скопления) обнаруживались чаще, чем при вакцинации БЦЖ и препаратом 2.

Анализ характера гранулем показал, что при вакцинации кандидатами K1 и K2 двукратно небольшие гранулемы с единичными эпителиоидными клетками обнаруживались часто, практически в том же проценте случаев, что и при иммунизации БЦЖ, однако в отличие от контроля вакцины, в этих группах мышей встречались и крупные преимущественно эпителиоидно-клеточные гранулемы, указывающие на выраженность экссудативной воспалительной реакции у этих мышей (табл. 3, 5). При использовании K2 однократно размер и клеточный состав гранулем были очень близки показателям мышей группы контроля вакцины.

Крупные лимфогистиоцитарные инфильтраты у мышей, получавших K1 и K2, регистрировались чаще, чем в контроле заражения, а у мышей, иммунизированных K2 однократно, даже несколько чаще, чем в группе контроля вакцины (табл. 5).

Таким образом, суммируя полученные данные, мы можем заключить, что при исследовании результатов профилактической иммунизации вакцинными кандидатами препарат 1 и препарат 2 в сравнении с действием вакцины БЦЖ наиболее отчетливое влияние на развитие эксперименталь-

ного туберкулеза у мышей получено при двукратной вакцинации препаратом 2.

Использование кандидатного вакцинного препарата 2 по сравнению с невакцинированными животными вызвало задержку развития туберкулеза по основным показателям тяжести течения инфекции, распространенности очагов специфического воспаления в ткани легких и выраженности альтерации.

При сравнении эффекта препарата 2 с действием БЦЖ можно говорить о близком уровне результатов профилактической иммунизации обеими вакцинами и даже о несколько большей стимуляции лимфоидного компонента воспалительной реакции в легких при иммунизации препаратом 2 по клеточному составу гранулем и выраженности лимфогистиоцитарной инфильтрации.

Однако решающее значение в результативности препарата 2 имеют данные бактериологического исследования, при котором индекс защиты легких составил 0,42 lg, что меньше, чем у мышей, иммунизированных БЦЖ. При использовании для вакцинации препарата 1 результативность была существенно меньше, чем у препарата 2, и проявилась лишь некоторой задержкой летальности мышей. В то же время при иммунизации препаратом 1 отмечена активация лимфоидного компонента воспалительной реакции в легких.

Обсуждение

Для создания безопасных и эффективных туберкулезных вакцин требуется проведение исследований по изучению всех основных антигенов микобактерии и их роли в формировании как гуморального, так и клеточного иммунного ответа. Известно, что не только белковые, но и липидные антигены способны создавать протективный эффект против вирулентных штаммов [21, 22]. Ориентация на гуморальный иммунный ответ как успешная стратегия большинства из имеющихся вакцин пока не нашла применения в исследованиях иммунологии туберкулеза.

Вот почему важно исследовать иммунный ответ на наиболее значимые белки, которыми являются ESAT-6 и CFP-10.

В нашем исследовании мы показали, что данные белки способны обеспечивать протективную защиту мышам, чувствительным к туберкулезной инфекции.

Также было показано, что иммунизация этими белками приводит к снижению микобактерий в легких по сравнению с группой непривитых мышей.

Следует также отметить, что применение белков ESAT-6 / CFP-10 вместе с адьювантом на основе бетулина в несколько раз усиливает иммунный ответ, что важно для разработки эффективной вакцины.

Наши результаты подтверждают ранее полученные данные для этих белков, включенные в состав экспериментальных вакцин, которые проходят клинические испытания. В частности, в России уже разработаны две экспериментальные ТБ-вакцины, успешно прошедшие ДКИ и готовые к клиническим испытаниям:

1. на основе рекомбинантного вируса гриппа TB FLU ESAT62A AG85A [11, 12];
2. рекомбинантная (*E. coli*) вакцина, содержащая гибридные белки ESAT6 / CFP10 и AG85A, связанные с декстраном и адьювантом олиго-СрG [13, 14].

Вместе с тем применение вакцин, содержащих компонент ESAT-6 или гибридный белок ESAT-6 / CFP-10,

в будущем лишит нас возможности использовать такие ТБ-диагностические тесты, как IGRA, t-spot и отечественный Диаскинтест [23], которые основаны на определении аллергической реакции на белки ESAT-6 / CFP-10. Поэтому необходимо уже сейчас наряду с разработкой новых вакцин озаботиться созданием новых тестов для оценки их эффективности, а также ТБ-скрининга населения в условиях применения этих вакцин [24].

Список литературы

1. Shenoi S, Friedland G. 2009. Extensively drug-resistant tuberculosis: a new face to an old pathogen. *Annu. Rev. Med.* 60: 307–320.
2. Zumla A, Raviglione M, Hafner R, von Reyn CF. 2013. Tuberculosis. *N. Engl. J. Med.* 368: 745–755.
3. Colditz GA, Berkey CS, Mosteller F, Brewer TF, Wilson ME, Burdick E, Fineberg HV. 1995. The efficacy of bacillus Calmette-Guerin vaccination of newborns and infants in the prevention of tuberculosis: meta-analyses of the published literature. *Pediatrics* 96: 29–35.
4. Colditz GA, Brewer TF, Berkey CS, Wilson ME, Burdick E, Fineberg HV, Mosteller F. 1994. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *JAMA* 271: 698–702.
5. Lambert PH, Hawkrigide T, Hanekom WA. 2009. New vaccines against tuberculosis. *Clin. Chest Med.* 30: 811–826.
6. Hussey G, Hawkrigide T, Hanekom W. 2007. Childhood tuberculosis: old and new vaccines. *Paediatr. Respir. Rev.* 8: 148–154.
7. Pitt JM, Blankley S, McShane H, O'Garra A. 2013. Vaccination against tuberculosis: how can we better BCG. *Microb. Pathog.* 58: 2–16.
8. Meyer J, McShane H. 2013. The next 10 years for tuberculosis vaccines: do we have the right plans in place. *Expert. Rev. Vaccines* 12: 443–451.
9. Ottenhoff TH, Kaufmann SH. 2012. Vaccines against tuberculosis: where are we and where do we need to go? *PLoS Pathog.* 8: e1002607.
10. Mak TK, Hesselting AC, Hussey GD, Cotton MF (2008). Making BCG vaccination programs safer in the HIV era. *Lancet* 372 (9641): 786–7. 67.
11. Sereinig S., Stukova M., Zabolotnyh N. [et al.] Influenza virus NS vectors expressing the mycobacterium tuberculosis ESAT-6 protein induce CD4+ Th1 immune response and protect animals against tuberculosis challenge. *Clin. Vaccine Immunol.* 2006 Aug; 13 (8): 898–904.
12. Далбаев Н.К., Жилин Е.С., Кайсенов Д.Н., Баракбаев К.Б., Сансызбай А.Р., Шурьгина А.П.С., Макарьев М.А., Никитов Б.А. Влияние структурообразующих и протективных компонентов на биологическую активность рекомбинантного вируса гриппа TB FLU ESAT62A AG85A в процессе приготовления и хранения экспериментальных образцов таблетированной формы вакцины против туберкулеза. // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. — 2014. — № 3. — С. 65–71.
13. A. B. Tkachuk, V. G. Lunin, A. S. Karyagina, and A. L. Gintsburg. Problems and prospects of development of the subunit TB vaccine. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2014 Apr; 65 (Suppl. 2): 43.
14. Патент РФ № 2539026 (опубликован 10.01.2015).
15. Comparing interferon-gamma release assays with tuberculin skin test for identifying latent tuberculosis infection that progresses to active tuberculosis: systematic review and meta-analysis. Auguste P1, Tsertsvadze A2, Pink J3, Court R3, McCarthy N2, Sutcliffe P3, Clarke A3. *BMC Infect Dis.* 2017 Mar 9; 17 (1): 200.
16. Sensitivity of C-Tb: a novel RD-1-specific skin test for the diagnosis of tuberculosis infection. Hoff ST, Peter JG, Theron G, Pascoe M, Tingskov PN, Aggerbeck H, Kolbus D, Ruhwald M, Andersen P, Dheda K. *Eur. Respir. J.* 2016; 47 (3): 919–28.
17. Diagnostics for latent TB infection: incremental, not transformative progress. Madhukar Pai1 and Giovanni Sotgiu. *Eur. Respir. J.* 2016; 47: 704–706.
18. Значение Диаскинтеста и Квантиферонового теста в диагностике туберкулеза у детей. Белушков В.В., Лозовская М.Э., Новик Г.А., Гурина О.П., Шибакowa Н.Д. *Фундаментальные исследования* № 7, 2012, стр. 34–39.
19. Диагностика туберкулеза. Туберкулин или диаскинтест — что выбрать? Кисличкин Н.Н., Фурс С.М., Красильников И.В., Зазимко Л.А. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы.* 2014, № 5. Стр. 50–55.
20. Изучение возможности использования нанодисперсии экстракта бересты в качестве адьюванта вакцинных препаратов И.В. Красильников, А.В. Иванов, А.М. Николаева, В.В. Машин // *Сиб. мед. журн.* — 2011. — Т. 26, № 2. — С. 65–67.
21. Andre S. Nell, Eva D'Irom, Patrick Bouic, Montserrat Sabaté, Ramon Bosser, Jordi Picas, Mercè Amat, Gavin Churchyard, Pere-Joan Cardona Safety, Tolerability, and Immunogenicity of the Novel Antituberculous Vaccine RUTI: Randomized, Placebo-Controlled Phase II Clinical Trial in Patients with Latent Tuberculosis Infection. *PLoS One*, Published: February 26, 2014.
22. Van Rhijn I, Ly D, Moody DB. 2013. CD 1a, CD 1b, and CD 1c in immunity against mycobacteria. *Adv. Exp. Med. Biol.* 783: 181–197.
23. Киселев В.И., Барановский П.М., Пупышев С.А., Рудых И.В., Перельман М.И., Пальцев М.А. Новый кожный тест для диагностики туберкулеза на основе рекомбинантного белка ESAT-CFP // *Молекулярная медицина.* 2008, № 4, с. 4–6.
24. Thomas R. Hawna, Tracey A. Dayb, Thomas J. Scribac, Mark Hatherillc, Willem A. Hanekomc, d, Thomas G. Evanse, Gavin J. Churchyard F., James G. Kublinb, Linda-Gail Bekkerh and Steven G. Selfi Tuberculosis Vaccines and Prevention of Infection. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* December 2014 Vol. 78. No. 4, 650–671.

