

Экспериментальное обоснование нового метода иммунодиагностики туберкулезных плевритов

1 - Уральский НИИ фтизиопульмонологии - филиал ФГБУ «НМИЦ ФПИ» Минздрава России, Екатеринбург; 2 - ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Екатеринбург; 3 - ГБУЗ СО «Противотуберкулезный диспансер», Екатеринбург

Kosareva O.V., Skornyakov S.N., Tsvirenko S.V., Fadina O.V., Karskanova S.S., Mel-yakh S.F.

Experimental substantiation of the new method of immunological diagnosis of tuberculous pleurisy

Резюме

На основании исследования 93 образцов плевральной жидкости больных туберкулезным и нетуберкулезным плевритом оценена репрезентативность базового и стимулированного уровней специфических (ИФН- γ) и неспецифических (ИЛ-6) биомаркеров в подтверждении туберкулезной этиологии воспаления. Синтез ИФН- γ в образцах плеврального выпота и периферической крови индуцировали рекомбинантным белком CFP10-ESAT6 в составе отечественного диагностикума «ДИАСКИНТЕСТ» по разработанной нами методике (патент РФ № 2664427). Концентрации ИФН- γ и ИЛ-6 определяли методом иммуноферментного анализа с использованием набора реагентов компании «Вектор-Бест» (Россия). Показано, что специфическая антигенная стимуляция клеток плеврального экссудата у больных туберкулезным плевритом, в отличие от выпота другой этиологии, сопровождается значительным и статистически высокозначимым ростом уровня ИФН- γ , что определяет перспективы ее применения в диагностике туберкулезной этиологии плевральных выпотов. Значимых различий базового и стимулированного уровней ИЛ-6 у пациентов с плевритом туберкулезной и нетуберкулезной этиологии не выявлено.

Ключевые слова: ИФН γ , ИЛ-6, туберкулезный плеврит, диагностика

Summary

The current study was performed to investigate the representativeness of the basic and antigen induced levels of specific (IFN- γ) and non-specific (IL-6) biomarkers for the diagnosis of tuberculous pleural effusion. Ninety-three samples of pleural fluid from patient with tuberculosis (TP) and non-tuberculosis (Non-TP) pleurisy were examined. Induction of the synthesis IFN-gamma by immunocompetent cells in pleural exudate was carried out by the recombinant protein CFP10-ESAT6 contained in the diagnosticum «DIASKINTEST» by our method (Patent RF, № 2664427; 2017). Serum and pleural fluid IFN- γ and IL-6 levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay technique (enzyme-amplified sensitivity immunoassay kits, Vector-Best reagent kit (Russia). Our results suggested that introduction of M. tuberculosis antigens into the pleural fluids samples of TP group caused a significant increase of the IFN- γ levels compared to basic level, which were not observed in the Non-TP group. Detection of IFN-gamma antigen-induced level in pleural fluid is a promising method for the diagnosis of tuberculous pleurisy. We found no significant differences in the basic and antigen-induced levels of IL-6 in patients with TP and Non-TP pleurisy.

Key words: IFN-gamma, IL 6, tuberculous pleurisy, diagnosis

Введение

Туберкулез, наряду с пневмонией и онкологическими заболеваниями является одной из основных причин плеврального выпота [1, 2, 3], особенно в регионах с высокой распространенностью туберкулезной инфекции [4].

Вследствие олигобацилярности выпота, а также об-

щезвестных ограничений в заборе материала для гистологического исследования подтверждение туберкулезной этиологии плеврита в рутинной клинической практике осуществляется путем исключения основных нозологий на основании косвенных диагностических критериев, включая результаты пробной терапии. Это определяет как длительность и риски ошибок диагностики, так и вы-

сокою актуальность поиска дополнительных маркеров специфической природы плеврита [5].

Среди биомаркеров, ассоциированных с туберкулезной этиологией плеврита, в современной литературе наибольшее внимание уделяется уровню ИФН- γ как индикатору специфических иммунных реакций, а также ИЛ-6 как наиболее значимому компоненту цитокиновой регуляции неспецифического воспалительного каскада. Так, Meng Zhang et al 2017, Chen KY et al 2016 выявили значимо более высокий уровень ИФН- γ в нативном плевральном выпоте больных туберкулезных плевритом по сравнению с плевритами иной этиологии [6, 7]. Возможности диагностики туберкулезной природы плеврита на основе оценки базового (неиндуцированного) уровня ИФН- γ в экссудате заложены в отечественном диагностическом наборе «Тубинферон» [8], однако работы, посвященные исследованию диагностической значимости этой методологии, крайне немногочисленны. Существенно большее число исследований посвящено тестам, основанным на оценке выраженности специфического ответа сенсibilизированных иммунокомпетентных клеток посредством активации синтеза ИФН- γ под влиянием специфической стимуляции. Рекомендованные производителями инструкции по применению наиболее известных диагностических тестов QuantiFERON-TB Gold и T – SPOT.TB такой возможности не предусматривают, однако в зарубежных исследованиях последних лет с использованием этих наборов получены весьма обнадеживающие результаты [9 - 13].

Исследования последних лет, направленные на изучение значимости медиаторов цитокинового каскада в оценке этиологии плеврита, достаточно противоречивы: в частности, Ying Tang et al 2014, Toossi Z. et al 2011 указывают на связь высокого уровня ИЛ-6 с туберкулезной этиологией процесса, включая пациентов с выраженной ВИЧ-индуцированной иммуносупрессией [14, 15], но в исследованиях Chen KY et al 2016 у пациентов с плевритом туберкулезной и нетуберкулезной этиологии статистически значимых различий по уровню ИЛ 6 в экссудате выявлено не было [6].

Цель исследования – оценить диагностическое значение динамики концентрации ИФН- γ и ИЛ-6 в ответ на специфическую антигенную стимуляцию клеток плеврального экссудата и периферической крови *in vitro* у пациентов с плевритом туберкулезной и иной этиологии.

Материалы и методы

Материал исследования: 93 образца плеврального экссудата, полученного путем плевральной пункции у пациентов с экссудативным плевритом туберкулезной и иной этиологии, госпитализированных с целью уточнения диагноза в клинику УНИИФ (с 2017 года НМИЦ ФПИ) Минздрава России в 2014– 2018 гг. Туберкулезную этиологию плеврита считали подтвержденной при выполнении диагностических критериев, предусмотренных федеральными клиническими рекомендациями по диагностике и лечению туберкулезного плеврита [16].

Плевральная жидкость получена от 38 пациентов с доказанной туберкулезной этиологией выпота (туберкулезный плеврит, ТП) - основная группа, и 55 пациентов с плевритом нетуберкулезной этиологии (НТП) - группа сравнения. Основными причинами плеврита в группе НТП были: первичные (рак легкого, мезотелиома плевры) и метастатические (рак молочной железы, кишечника) опухоли различных гистологических форм - 56,4% (31); воспалительный выпот неинфекционного генеза как проявление активности диффузных заболеваний соединительной ткани и других болезней с аутоиммунным механизмом - 23,6% (13); парапневмонический выпот - 9,1% (5); у 10,9 % (6) пациентов нетуберкулезная природа выпота подтверждена многократными отрицательными результатами лабораторных тестов, а также дальнейшим наблюдением за течением болезни для исключения вялотекущих и атипичных форм ТП.

Образцы плевральной жидкости пациентов, имеющих заболевания, значимо влияющих на параметры иммунного статуса: ВИЧ-инфекцию, состояния после лучевой терапии, химиотерапии, в исследование не включали.

Синтез ИФН- γ в образцах плеврального выпота и периферической крови индуцировали рекомбинантным белком CFPI0-ESAT6 в составе отечественного диагностического набора «ДИАСКИНТЕСТ» по разработанной нами ранее методике (патент РФ «Способ диагностики туберкулезной этиологии плеврита» [17]. Концентрацию ИФН- γ (пг/мл) и ИЛ-6 (пг/мл) определяли методом иммуноферментного анализа с использованием набора реагентов компании «Вектор-Бест» (Россия).

Предварительная подготовка образцов для определения концентрации ИФН- γ проведена по следующему алгоритму: образцы плеврального экссудата и периферической крови объемом по 1 мл смешивали с 0,02 мл, 0,05 мл и 0,1 мл раствора антигенов, инкубировали 24 ч при температуре 37 0С, затем определяли антигениндуцированный уровень ИФН- γ : Ag20ИФН γ , Ag50ИФН γ , Ag100ИФН γ соответственно. Нативный образец также инкубировали 24 ч при температуре 37 0С и определяли базовый уровень ИФН- γ (AgniiИФН γ).

Предварительная подготовка образцов для определения концентрации ИЛ-6 проведена следующим образом: периферическую кровь и плевральную жидкость объемом по 1 мл смешивали с 0,1 мл раствора антигенов, инкубировали 24 ч при температуре 37,0 0С, затем определяли антигениндуцированный уровень ИЛ-6 (Ag100ИЛ6); нативные образцы, также инкубировали 24 ч при температуре 37 0С и определяли базовый уровень ИЛ-6 (AgniiИЛ6).

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программы Statistica 6.0. Характер распределения данных оценивали по критерию Колмогорова-Смирнова. Данные представлены в виде медианы с указанием первого и третьего квартиля Me (Q1-Q3). Статистическую значимость различий оценивали по критерию Манна-Уитни и Вилкоксона. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

Таблица 1 . Показатели базовой и антигениндуцированной концентрации ИФН-γ в периферической крови пациентов с туберкулезным и нетуберкулезным плевритом

	НТП		ТП		p ^{НТП и ТП}
	Me (пг/мл)	Q1-Q3 (пг/мл)	Me (пг/мл)	Q1-Q3 (пг/мл)	
Ag ⁰⁰ ИФНγ	0,0	0,0-0,0	0,0	0,0-1,89	0,69
Ag ²⁰ ИФНγ	0,0	0,0-0,53	0,0	0,0-2,33	0,87
	p ^{Ag²⁰00ИФНγ и Ag⁰⁰00ИФНγ} =0,7		p ^{Ag²⁰00ИФНγ и Ag⁰⁰00ИФНγ} =0,6		
Ag ⁵⁰ ИФНγ	0,0	0,0-1,73	0,0	0,0-5,76	0,99
	p ^{Ag⁵⁰00ИФНγ и Ag⁰⁰00ИФНγ} =0,5		p ^{Ag⁵⁰00ИФНγ и Ag⁰⁰00ИФНγ} =0,9		
Ag ¹⁰⁰ ИФНγ	0,0	0,0-1,63	0,0	0,0-0,0	0,53
	p ^{Ag¹⁰⁰00ИФНγ и Ag⁰⁰00ИФНγ} =0,4		p ^{Ag¹⁰⁰00ИФНγ и Ag⁰⁰00ИФНγ} =0,6		

Результаты и обсуждение

Исследование ИФН-γ в образцах периферической крови (табл.1) показало следующее:

- статистически значимых различий по базовому уровню этого показателя у больных туберкулезным (ТП) и нетуберкулезным (НТП) плевритом не выявлено (p>0,05). Медиана концентрация ИФН-γ в образцах составила 0,0 пг/мл.
- значимой динамики уровня ИФН-γ после специфической стимуляции образцов также не зарегистрировано (p>0,05). Медиана антиген-индуцированной концентрации ИФН-γ, независимо от дозы антигенов, составила 0,0 пг/мл.

Исследование ИФН-γ в образцах плеврального выпота (табл.2) показало следующее:

- базовый уровень концентрации ИФН-γ в образцах пациентов с туберкулезным плевритом (ТП) значимо выше, чем в группе НТП, медиана концентрации составила 111,9 пг/мл и 0,0 пг/мл (p=0,000000016).
- специфическая стимуляция образцов плеврального экссудата пациентов группы НТП не сопровождалась значимым изменением концентрации ИФН-γ.
- специфическая стимуляция образцов плеврального экссудата пациентов группы ТП с использо-

ванием 0,02 мл, 0,05мл и 0,1 мл раствора антигенов M. tuberculosis привела к значимому увеличению концентрации ИФН-γ по сравнению с базовым уровнем в 2,4 раза (p=0,0005), 5,2 раза (p=0,003) и 4,2 раза (p=0,00007) соответственно.

Исследование ИЛ-6 в образцах периферической крови (табл.3) показало следующее:

- медиана базовой концентрация ИЛ-6 в группах НТП и ТП значимо не различалась и составила 46,0 пг/мл и 35,0 пг/мл соответственно (p=0,4).
- специфическая антигенная стимуляция не привела к значимому изменению уровня ИЛ-6 относительно базового в обеих группах больных: медиана антиген-стимулированного уровня ИЛ-6 в группе НТП составила 27,5 пг/мл, в группе ТП 23,0 пг/мл (p=0,5) (рис.1).

Исследование ИЛ-6 в образцах плевральной жидкости (табл.4) показало следующее:

- медиана базовой концентрации ИЛ-6 в группе НТП и ТП составила 37360,0 пг/мл и 51136,0 пг/мл (p=0,9).
- внесение антигенов M. tuberculosis в исследуемые образцы не привело к значимому изменению уровня ИЛ-6 в обеих наблюдаемых группах: медиана антиген-стимулированного уровня ИЛ-6 в группе НТП состави-

Таблица 2. Показатели базовой и антигениндуцированной концентрации ИФН-γ в плевральной жидкости пациентов с туберкулезным и нетуберкулезным плевритом

	НТП (n=55)		ТП (n=38)		p ^{НТП и ТП}
	Me (пг/мл)	Q1-Q3 (пг/мл)	Me (пг/мл)	Q1-Q3 (пг/мл)	
Ag ⁰⁰ ИФНγ	0,0	0,0-6,65	111,9	3,07-258,5	(0,0016) ⁻⁵
Ag ²⁰ ИФНγ	0,0	0,0-6,5	264,4	23,34-2427,6	(0,00013) ⁻⁵
	p ^{Ag²⁰00ИФНγ и Ag⁰⁰00ИФНγ} =0,8		p ^{Ag²⁰00ИФНγ и Ag⁰⁰00ИФНγ} =0,0005		
Ag ⁵⁰ ИФНγ	0,0	0,0-8,4	580,62	18,03-2988,3	(0,00009) ⁻⁵
	p ^{Ag⁵⁰00ИФНγ и Ag⁰⁰00ИФНγ} =0,9		p ^{Ag⁵⁰00ИФНγ и Ag⁰⁰00ИФНγ} =0,0003		
Ag ¹⁰⁰ ИФНγ	0,0	0,0-6,1	475,1	28,1-2434,0	(0,000005) ⁻⁵
	p ^{Ag¹⁰⁰00ИФНγ и Ag⁰⁰00ИФНγ} =0,8		p ^{Ag¹⁰⁰00ИФНγ и Ag⁰⁰00ИФНγ} =0,00007		

Таблица 3. Показатели базовой и антигениндуцированной концентрации ИЛ-6 в периферической крови пациентов с туберкулезным и нетуберкулезным плевритом

	НТП		ТП		$p^{\text{НТП} \times \text{ТП}}$
	Me (пг/мл)	Q1-Q3 (пг/мл)	Me (пг/мл)	Q1-Q3 (пг/мл)	
Ag ^{нп} ИЛ-6	46,0	14,1-149,6	35,0	13,8-68,3	0,4
Ag ^{тп} ИЛ-6	27,5	10,7-95,1	23,0	11,0-60,8	0,5
	$p^{\text{Ag}^{100\text{ИЛ-6}} \times \text{Ag}^{\text{нпИЛ-6}}} = 0,25$		$p^{\text{Ag}^{100\text{ИЛ-6}} \times \text{Ag}^{\text{тпИЛ-6}}} = 0,86$		

Таблица 4. Показатели базовой и антигениндуцированной концентрации ИЛ-6 в плевральной жидкости пациентов с туберкулезным и нетуберкулезным плевритом

	НТП		ТП		$p^{\text{НТП} \times \text{ТП}}$
	Me (пг/мл)	Q1-Q3 (пг/мл)	Me (пг/мл)	Q1-Q3 (пг/мл)	
Ag ^{нп} ИЛ-6	37360,0	21820,4 – 105040,0	51136,0	18276,9 – 87200,0	0,9
Ag ^{тп} ИЛ-6	35443,7	20818,0 – 100992,0	42170,8	29576,0 – 82020,6	0,7
	$p^{\text{Ag}^{100\text{ИЛ-6}} \times \text{Ag}^{\text{нпИЛ-6}}} = 0,2$		$p^{\text{Ag}^{100\text{ИЛ-6}} \times \text{Ag}^{\text{тпИЛ-6}}} = 0,7$		

ла 35443,7 пг/мл, в группе ТП - 42 170,8 пг/мл ($p=0,7$) (рис.2).

Базовый и антиген-индуцированный уровни ИФН- γ в плевральном выпоте у пациентов с туберкулезным плевритом оказались значимо выше, чем в экссудате больных плевритом нетуберкулезной этиологии, что указывает на ценность исследования данных параметров на этапе дифференциальной диагностики. Однако существенно более выраженный рост антиген-индуцированного уровня ИФН гамма как проявление эффективной стимуляции сенсibilизированных функционально активных клеток плеврального экссудата рекомбинантным белком CFP10-ESAT6 определяют перспективы использования данной методологии для подтверждения туберкулезной этиологии плеврита.

Сопоставления выраженности различий концентрации исследуемых биомаркеров в крови и экссудате свидетельствуют о более высокой диагностической ценности исследования плеврального экссудата, нежели периферической крови, при установлении туберкулезной этиологии плеврита.

В ходе проведенного исследования, в отличие от показателей концентрации ИФН- γ , нам не удалось зарегистрировать наличие значимых различий базового уровня ИЛ-6 у пациентов с плевритом туберкулезной и нетуберкулезной этиологии как в плевральной жидкости, так и периферической крови. Специфическая антигенная стимуляция образцов плевральной жидкости и периферической крови также не привела к изменению уровня ИЛ-6 у пациентов с туберкулезным плевритом, а также соотношений величин этого показателя у больных с плевритом туберкулезной и иной этиологии.

Заключение

Стимулирование функционально активных клеток плеврального экссудата рекомбинантным белком CFP10-ESAT6 в тесте *in vitro* в широком диапазоне доз в образцах пациентов с туберкулезным плевритом сопровождается существенным ростом концентрации ИФН- γ , что имеет диагностическое значение, существенно превосходящее исследование базового уровня ИФН- γ , и может быть положено в основу нового метода лабораторной диагностики туберкулезных плевритов.

Значимых различий базового и стимулированного уровней ИЛ-6 у пациентов с плевритом туберкулезной и нетуберкулезной этиологии не выявлено. ■

Косарева Ольга Викторовна - врач клинической лабораторной диагностики УНИИФ - филиал ФГБУ «НМИЦ ФПИ» Минздрава России, г. Екатеринбург. Адрес для переписки: 620039, 22 Партсъезда 50, email - kos080389@mail.ru; **Скорняков С.Н.** - д.м.н., профессор, руководитель научно-организационного отдела УНИИФ - филиала ФГБУ «НМИЦ ФПИ» Минздрава России, заведующий кафедрой фтизиатрии и пульмонологии, ФГБОУ ВО «УГМУ» Минздрава России, г. Екатеринбург, email - sns@urniif.ru; **Цвиренко С.В.** - д.м.н., профессор, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики и бактериологии ФПК и ИП, ФГБОУ ВО «УГМУ» Минздрава России, г. Екатеринбург. Адрес для переписки - 620028 г. Екатеринбург, ул Репина д 3. email - usma@usma.ru; **Фадина О.В.** - врач клинической лабораторной диагностики, заведующая клинико-диагностическим отделением, УНИИФ - филиал ФГБУ «НМИЦ ФПИ» Минздрава России, г. Екатеринбург, email - fadina@urniif.ru;

Карсканова С.С. - к.м.н., заместитель главного врача по медицинской части, ГБУЗ СО «Противотуберкулезный диспансер», доцент кафедры фтизиатрии и пульмонологии, ФГБОУ ВО «УГМУ» Минздрава России, г.

Екатеринбург, ул. Чапаева, 9а; **Мелях С.Ф.** - к.м.н., врач функциональной диагностики, УНИИФ - филиал ФГБУ «НМИЦ ФПИ» Минздрава России, г. Екатеринбург, email - urniif@urniif.ru

Литература:

1. Соколов В.А. Плевриты. Екатеринбург: Изд-во «Баско»; 1998, 240 с.
2. Стогова Н.А. Тюхин Н.С. Особенности диагностики парапневмонического и туберкулезного экссудативного плеврита. Пульмонология. 2004; 5: 51-54.
3. Maldonado F, Lentz RJ and Light RW. Diagnostic approach to pleural diseases: new tricks for an old trade [version 1; referees: 2 approved]. F1000Research. 2017; 6 (F1000 Faculty Rev): 1135.
4. Li M, Luo Z, Zhu W, Khan RS, Saeed U, Shi S. Diagnostic accuracy of tumor necrosis factor-alpha assay for tuberculous pleurisy: A PRISMA-compliant meta-analysis. Medicine (Baltimore). 2016; Nov;95(48):e5510.
5. Li M, Luo Z, Zhu W, Khan RS, Saeed U, Wang R, Shi Si, Luo Z Accuracy of interleukin-27 assay for the diagnosis of tuberculous pleurisy: A PRISMA-compliant meta-analysis. Medicine (Baltimore). 2017; Dec; 96(50): e9205.
6. Chen KY, Feng PH, Chang CC, Chen TT, Chuang HC, Lee CN, Su CL, Lin LY, Lee KY. Novel biomarker analysis of pleural effusion enhances differentiation of tuberculous from malignant pleural effusion. Int J Gen Med. 2016; 11(9):183-9.
7. Zhang M, Xiong D, Li H2, Wang Z, Li R. Diagnostic value of T-Spot TB combined with INF- γ and IL-27 in tuberculous pleurisy. Exp Ther Med. 2018; 15(2):1871-1874
8. Владимирский М.А., Мордовская Л.И., Аксенова В.А., Шитина Л.А., Аксенова Е.И., Сергиенко О.В. и соавт. Разработка и применение отечественной тест-системы диагностики туберкулезного инфицирования на основе количественного анализа индукции интерферона-гамма в образцах цельной крови *in vitro* с использованием специфических рекомбинантных антигенов. Клиническая лабораторная диагностика. 2010; 1: 49-54.
9. Cirak A.K., Komurcuoglu B., Tekgul S. et al. The diagnostic efficiency of QuantiFERONTB®-Gold test in the diagnosis of tuberculous pleurisy. International Journal of Mycobacteriology. 2012; 1(4): 180-184.
10. Kang J.Y., Rhee C.K., Kang N.H. et al. Clinical Utility of Two Interferon-gamma Release Assays on Pleural Fluid for the Diagnosis of Tuberculous Pleurisy. Tuberc Respir Dis. 2012; 73 (3): 143 - 150.
11. Adilistya T., Astrawinata D.A., Nasir U.Z. Use of Pleural Fluid Interferon-gamma Enzyme-linked Immunospot Assay in the Diagnosis of Pleural Tuberculosis. Acta Med Indones. 2016; 48 (1): 41-47.
12. Losi M., Bossink A., Codecasa L. et al. Use of a T-cell interferon-gamma release assay for the diagnosis of tuberculous pleurisy. Eur Respir J. 2007; 30 (6): 1173–1179.
13. Liu F., Gao M., Zhang X. et al. Interferon-Gamma Release Assay Performance of Pleural Fluid and Peripheral Blood in Pleural Tuberculosis. PLoS One. 2013; 8 (12): e83857.
14. Ying Tang, Shu-Cheng Hua, Gui-Xiang Qin, Li-Jun Xu, Yan-Fang Jiang Different Subsets of Macrophages in Patients with New Onset Tuberculous Pleural Effusion. PLoS One. 2014; 9 (2): e88343.
15. Toossi Z., Hirsch C. S., Wu M. et al. Distinct cytokine and regulatory T cell profile at pleural sites of dual HIV/ tuberculosis infection compared to that in the systemic circulation. Clin Exp Immunol. 2011; 163 (3): 333–338.
16. Васильева И. А., Амансахедов Р. Б., Багдасарян Т. Р., Багиров М. А., Варин А. А., Викторова И. Б. и соавт. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению туберкулезного плеврита. Российская Федерация, 03.10.2014 [электронный ресурс] http://roftb.ru/netcat_files/doks2015/rec6.pdf. - Дата обращения. – 6.04.2018
17. Скорняков С.Н., Косарева О.В., Фадиной О.В., Карсканова С.С., Мелях С.Ф. Способ диагностики туберкулезной этиологии плеврита. Патент РФ № 2664427; 2017