

НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ В РАННЕЙ ДИАГНОСТИКЕ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ ОМСКОЙ ОБЛАСТИ

Плеханова М.А.¹, Кривцова Л.А.¹, Белкова Т.Н.¹, Дакуко А.Н.¹, Оксеньчук Т.В.¹, Гончарова Т.А.¹

¹ФГБОУ ВО Омский государственный медицинский университет Минздрава России, Омск, e-mail: dina-plus@mail.ru

В настоящее время большой интерес представляет изучение иммуногенности различных антигенов *M. tuberculosis* у больных активным туберкулезом для повышения специфичности и чувствительности диагностических тестов. Целью настоящего исследования было оценить антигены микобактерий туберкулеза для ранней диагностики туберкулезной инфекции у детей. Для этого были обследованы 54 ребенка в возрасте до 17 лет, из них у 25 детей (46,3%) установлен туберкулез, 13 детей (24,1%) составили группу высокого риска с неуточненным диагнозом туберкулеза, 11 детей (20,4%) — с латентной туберкулезной инфекцией и 5 (9,2%) — не инфицированных МБТ. Всем детям, помимо общепринятых исследований, проведены специфические тесты *in vitro* по определению гамма-интерферона в цельной крови после 72-часовой стимуляции туберкулином и рекомбинантными антигенами микобактерий туберкулеза (ESAT6, 85a, CFP32B, Rv2660c, ESAT6-CFP10). Анализируя полученные результаты, установили, что сохранил свою значимость туберкулин для оценки напряженности специфического иммунитета. Антигены ESAT6 и Rv2660c явились наиболее значимыми для диагностики латентной туберкулезной инфекции, а гибридный белок ESAT6-CFP10 — для диагностики туберкулеза.

Ключевые слова: латентная туберкулезная инфекция, туберкулез, дети, специфические антигены: ППД-Л, ESAT6, 85a, CFP32B, Rv2660c, ESAT6-CFP10, специфические тесты *in vitro* для определения интерферона-гамма

NEW POSSIBILITIES IN EARLY DIAGNOSTICS OF TUBERCULOSIS INFECTION AMONG CHILDREN IN OMSK REGION

Plekhanova M.A.¹, Krivtsova L.A.¹, Belkova T.N.¹, Dakuko A.N.¹, Oksenchuk T.V.¹, Goncharova T.A.¹

¹FSBEI Omsk state medical University of Ministry of Health of Russia, Department of Pediatrics DPO, Omsk, e-mail: dina-plus@mail.ru

Currently a large interest to study the immunogenicity of various antigens of *M. tuberculosis* in patients with active TB, to increase the specificity and sensitivity of diagnostic tests. The purpose of this study was to evaluate the antigens of *Mycobacterium tuberculosis* for early diagnosis of tuberculosis infection in children. For this 54 children under the age of 17 years were examined, including 25 children (46.3 per cent) installed TB 13 children (24.1 percent) made up the group of high risk unspecified diagnosis of TB, 11 patients (20,4%) with latent tuberculosis infection and 5 (9,2%) not infected with *M. tuberculosis*. All children, in addition to conventional studies conducted by specific *in vitro* tests for the determination of gamma-interferon in whole blood after 72 hour stimulation with tuberculin and recombinant antigens of *Mycobacterium tuberculosis* (ESAT6, 85a, CFP32B, Rv2660c, ESAT6-CFP10). Analyzing the results found that tuberculin retained its significance for evaluation of the intensity of specific immunity. Antigens ESAT6 and Rv2660c were most significant for the diagnosis of latent tuberculosis infection, and the hybrid protein ESAT6-CFP10 for diagnosis of tuberculosis.

Keywords: latent tuberculosis, tuberculosis, children, specific antigens: PPD-L, ESAT6, 85a, CFP32B, Rv2660c, ESAT6-CFP10, specific *in vitro* tests for the determination of interferon-gamma

Основными методами активного выявления туберкулезной инфекции у детей в России остаются проба Манту с 2 ТЕ ППД-Л (туберкулин) и диаскинтест (ДСТ) [3, 4].

В качестве альтернативных специфических тестов в последнее время в нашей стране используются тесты *in vitro*. Гибрид двух антигенов — ESAT6 и CFP10 — включен в специфические диагностические тесты, основанные на продукции ИФН- γ в ответ на

стимуляцию этими антигенами (IGRA – Interferon Gamma Release Assays) [7]. Тесты IGRA оказались высокоспецифичными (до 99%), но имели низкую чувствительность [1, 5, 13].

Для повышения специфичности и чувствительности иммуноферментного анализа (ИФА) продолжают поиски более специфичных антигенов, в том числе полученных генно-инженерным путем [6]. Среди нескольких групп антигенов *M. tuberculosis* с протективной активностью центральное место занимают секретируемые белки [12].

Недавно у лиц, инфицированных МБТ, был обнаружен белок CFP32 [11]. По результатам ИФА у 32% больных легочной формой туберкулеза в сыворотке обнаруживались антитела против CFP32, а сам белок выявлялся в сыворотке 56% больных [11]. Результаты другого исследования показали, что CFP32 (также известен как Rv0577 и TB27.3) мог регулировать врожденный и адаптивный иммунитет [8].

Группа ученых под руководством профессора Андерсена (2011) обнаружила шесть генов, экспрессия которых не зависела от стадии инфекции, и продуктом одного из этих генов являлся белок Rv2660с. В исследованиях Stefan Ehlers и Ulrich E. Schaible (2013) Rv2660с определялся на протяжении всего периода инфекции у мышей, но при этом оставался слабым индуктором ИФН- γ [9].

Таким образом, несмотря на проводимые исследования, данные по специфическим антигенам противоречивы; требуется дальнейшее их изучение.

Цель исследования

Оценка специфических антигенов для ранней диагностики туберкулезной инфекции у детей.

Материал и методы исследования

В исследование были включены 54 ребенка в возрасте от 1 года до 17 лет. Основная часть детей (N=54, n=38; 70,4%) была госпитализирована в специализированную туберкулезную детскую клиническую больницу г. Омска в 2014–2016 гг., из них 65,8% детей (N=38, n=25) с подтвержденным диагнозом туберкулеза (ТБ) (группа «ТБ»), 34,2% детей (N=38, n=13) из группы высокого риска по ТБ (группа «ГР ТБ»): дети из контакта с больным ТБ (N=13, n=8; 61,5%) и инфицированные МБТ с признаками активности туберкулезной инфекции (N=13, n=9; 69,2%), в двух случаях (N=13, 15,4%) имелись локальные изменения в легочной ткани, без признаков активности туберкулезной инфекции. Среди детей с подтвержденным диагнозом ТБ в 24% (N=25, n=6) установили инфильтративный туберкулез легких (ИТЛ), в 4% (N=25, n=1) — диссеминированный туберкулез легких, в 32% (N=25, n=8) — первичный туберкулезный комплекс (ПТК) и в 40% (N=25, n=10) — туберкулез внутригрудных лимфатических узлов (ТВЛУ). Туберкулез в фазе инфильтрации был установлен у 68% пациентов (N=25, n=17), в фазе распада — у 8% (N=25, n=2), в фазе

обсеменения — у 4% (N=25, n=1) и кальцинации — у 20% (N=25, n=5). У большей части детей, больных ТБ (35, 92,1%), бактериовыделение не регистрировали (МБТ-).

В амбулаторных условиях было обследовано 29,6% детей (N=54, n=16), из них 31,3% пациентов (N=16, n=5) не были инфицированы микобактериями туберкулеза (МБТ) (группа «НТ»), при этом в 18,7% (N=16, n=3) установили поствакцинальную аллергию. У 68,7% пациентов (N=16, n=11) было установлено инфицирование МБТ – латентная туберкулезная инфекция (группа «ЛТИ»), из них в 31,3% случаев (N=16, n=5) инфицированы МБТ были в течение года, в 37,5% (N=16, n=6) более года.

Диагноз ТБ основывался на результатах клинических, лабораторных, в том числе бактериологических (бактериоскопия на кислотоустойчивые микобактерии – окраска мазка патологического материала по Циль—Нильсену, посев на МБТ – на жидкие среды системы Вастес 960 и твердые среды Левенштейна—Йенсена), молекулярно-генетических (ПЦР на ДНК к МБТ), лучевых (рентгенография органов грудной клетки, простая томография и мультиспиральная компьютерная томография органов грудной клетки, ультразвуковое исследование органов брюшной полости) методов. Учитывались результаты туберкулинодиагностики (проба Манту с 2 ТЕ ППД-Л) и пробы с ДСТ.

Дополнительно всем детям было проведено специфическое иммунологическое исследование. Исследование включало определение ИФН- γ в цельной крови после 72-часовой индукции специфическими антигенами: ППД-Л, CFP32B, Rv2660c, ESAT6, 85a, ESAT6-CFP10. Оценку уровня специфического ИФН- γ проводили по определению индекса стимуляции (и.с.) и в пг/мл [2]. Специфические антигены (CFP32B, Rv2660c, ESAT6, 85a, ESAT6-CFP10) были выделены в лаборатории трансляционной биомедицины отдела генетики и молекулярной биологии бактерий ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи.

Размер выборки пациентов, минимально достаточный для получения доказательных данных, был рассчитан в программе OpenEpi, версии 3. Полученные данные обрабатывались с использованием статистических программ Statistica 6,0 и Biostat.

На проведение данного исследования получено разрешение этического комитета Омской государственной медицинской академии (протокол № 51 от 10.10.2012 г.). Для участия детей в иммунологическом исследовании от родителей или их законных представителей было получено добровольное информированное согласие.

Публикация подготовлена в рамках поддержанного РГНФ научного проекта № 16-16-55001 (исследование проведено за счет средств областного бюджета Омской области и Фонда).

Результаты исследования и их обсуждение

Средний возраст детей, включенных в исследование, составил $6,9 \pm 0,7$ лет, девочек было 53,7% (N=54, n=29) и мальчиков 46,3% (N=54, n=25). Половина детей была из социально-благополучных семей (N=54, n=27). Из социально-неблагополучных семей в основном были дети с установленным диагнозом ТБ ($p=0,005$), также чаще эти дети были из семейного ($p=0,015$), бациллярного ($p=0,013$) очага туберкулеза. Среди детей с ЛТИ чаще регистрировалиотягощенный аллергологический анамнез ($p=0,001$), частые респираторные заболевания ($p=0,027$).

Среди детей, больных ТБ, уровень чувствительности к ППД-Л был достоверно выше, чем среди детей с ЛТИ и не инфицированных МБТ ($p<0,05$). В целом положительные реакции регистрировались у большей части детей, больных туберкулезом, с ЛТИ и из группы риска.

Оценивая чувствительность к ДСТ, установили статистически значимые различия по уровню ответа к рекомбинантному аллергену среди детей, больных ТБ и ЛТИ, и не инфицированных МБТ ($p<0,0001$). Отсутствовали различия и среди детей из группы «ТБ» и группы «ГР ТБ» ($p=0,167$), что свидетельствовало о высокой активности туберкулезной инфекции и необходимости исключения локального туберкулезного процесса. Также не выявили значимых различий по уровню чувствительности к ДСТ среди детей с ЛТИ и не инфицированных МБТ ($p=0,472$). У большей части детей, как больных ТБ, так и группы риска по ТБ, отметили гиперергические реакции на ДСТ, среди детей с ЛТИ эти реакции не регистрировались.

Уровень продукции индуцированного ИФН- γ в цельной крови представлен в таблице 1. Индукция проведена специфическими антигенами: ППД-Л, ESAT6, 85a, ESAT6-CFP10, CFP32B, Rv2660c.

Таблица 1

Уровень специфического ИФН- γ у детей, исследуемых групп (пг/мл)

Антигены	ТБ*, n=25	ЛТИ*, n=11	НТ*, n=5	ГР ТБ*, n=13	Критерий Краскела—Уоллиса (H), p
	ME (Q _{25%} :Q _{75%})	ME (Q _{25%} :Q _{75%})	ME (Q _{25%} :Q _{75%})	ME (Q _{25%} :Q _{75%})	
ППД-Л	661,9 (159:1010)	95 (15,6:122)	0	539,8 (156:691)	H=22,663; p=0,000
ESAT6	14,5 (0:19)	65,9 (3,5:75)	14 (0:0)	41,2 (0:43)	H=5,739; p=0,165
85a	12,8 (0:6)	18,4 (0:9,5)	8,8 (0:4)	5,8 (0:3)	H=2,029; p=0,775
ESAT6-CFP10	90 (6:131)	0,1 (0:0)	0	101,5 (0:143)	H=24,681; p=0,000

CFP32В	14,9 (0:31)	38,5 (1:52,5)	11 (0:0)	18,3 (3,5:27)	H=3,288; p=0,473
Rv2660с	32,6 (0:18)	94,1 (9:171)	22 (0:0)	46,9 (9:60)	H=9,978; p=0,024

Примечание: *ТБ — больные туберкулезом; ЛТИ — латентная туберкулезная инфекция; НТ — не инфицированные МБТ; ГР ТБ — группа риска по туберкулезу.

Так, среди детей, больных ТБ, уровень ИФН- γ (пг/мл) статистически значимо отличался от показателей детей с ЛТИ ($p_{\text{ТБ-ЛТИ}}=0,001$) и не инфицированных МБТ ($p_{\text{ТБ-НТ}}=0,014$). Не были установлены различия показателей детей, больных ТБ, и из группы риска по ТБ ($p=0,311$), что подтверждало высокий риск развития заболевания. Результаты и.с. оказались более информативными для определения ЛТИ и менее значимыми для оценки активности туберкулезной инфекции ($N=3,141$; $p_{\text{ТБ-ЛТИ-ГР ТБ}}=0,208$), что подтвердила и установленная умеренная корреляция (по Спирмену, $r=0,49$, $p=0,004$) между показателями ИФН- γ индуцированного ППД-Л (и.с.) и пробы Манту с 2 ТЕ ППД-Л (мм).

Оценивая результаты гибридного белка (ESAT6-CFP10) в качестве митогена, установили статистически значимые различия между показателями (и.с.) детей, больных ТБ, с ЛТИ ($p_{\text{ТБ-ЛТИ}}=0,003$) и не инфицированных МБТ ($p_{\text{ТБ-НТ}}=0,043$). При этом у детей из группы риска по ТБ не установили различий ($p_{\text{ТБ-ГР ТБ}}=0,364$), что также подтверждало высокий риск развития заболевания. Показатели не различались у детей с ЛТИ и не инфицированных МБТ. Была установлена умеренная корреляция (по Спирмену, $r=0,27$, $p=0,04$) между показателями ИФН- γ индуцированного ESAT6-CFP10 (и.с.) и пробы с ДСТ (мм).

Оценивая результаты уровня ИФН- γ после индукции ESAT6, входящего в состав гибридного, установили статистически значимые различия в группах «ТБ» и «ЛТИ», при этом показатель индекса стимуляции был ниже у детей с установленным ТБ и выше у детей с ЛТИ ($p_{\text{ТБ-ЛТИ}}=0,035$), а при отсутствии туберкулезной инфекции ($p_{\text{ТБ-НТ}}=0,902$) и при высоком риске заболевания показатели достоверно не различались ($p_{\text{ТБ-ГР ТБ}}=0,066$). Результаты уровня ИФН- γ после индукции антигеном 85а (и.с.) в группах сравнения статистически не различались ($N=2,581$; $p=0,528$).

Уровень ИФН- γ после индукции CFP32В (и.с.) у пациентов из группы «ЛТИ» статистически значимо не отличался от показателей у детей из групп «ТБ» ($p=0,07$), «НТ» ($p=0,383$) и «ГР ТБ» ($p=0,256$). Определили прямую зависимость между уровнем ИФН- γ после индукции белком ESAT6 и CFP32В ($r=0,80$). Полученные результаты по антигену CFP32В позволили его рассматривать как белок ранней стадии туберкулезной инфекции.

По результатам исследования установили высокий уровень ИФН- γ при индукции Rv2660c у пациентов группы «ЛТИ», и.с. составил $7,2 \pm 2,5$ ($Q_{25\%}:Q_{75\%}$ 0,5:15), который статистически значимо отличался от уровня у пациентов группы «ТБ» (и.с. $2,3 \pm 0,8$, $Q_{25\%}:Q_{75\%}$ 0:1,3), $p=0,016$. Показатель не определялся в группе «НТ», уровень ИФН- γ в группе «ГР ТБ» соответствовал значению группы «ТБ». Определяя корреляцию между показателем (и.с.), полученным после индукции ESAT6, и показателем уровня ИФН- γ при индукции Rv2660c, установили статистически значимую умеренную зависимость ($r=0,396$, $p=0,005$). Также установили, что существовала прямая статистически значимая умеренная зависимость между показателями ИФН- γ при индукции Rv2660c и CFP32B ($r=0,561$, $p=0,00002$). Поэтому антиген Rv2660c, так же как и CFP32B, отнесли к белку ранней стадии туберкулезной инфекции.

Полученные нами данные подтвердили роль антигенов CFP32B и Rv2660c как белков ранней стадии туберкулезной инфекции [8, 9]. При этом, в отличие от экспериментальных исследований, проведенных Stefan Ehlers и Ulrich E. Schaible (2013) [9], антиген Rv2660c показал себя как сильный индуктор ИФН- γ в период латентной туберкулезной инфекции и определялся у большей части детей группы «ЛТИ» (63,6%). При этом данный антиген показал себя слабым индуктором при развитии туберкулеза, что позволило его рекомендовать для ранней диагностики туберкулезной инфекции. Антиген CFP32B, в отличие от Rv2660c, выявлялся с одинаковой частотой у детей группы «ТБ» (28%) и «ЛТИ» (27,3%), несмотря на тенденцию к более выраженному ответу индуцированного ИФН- γ в группе «ЛТИ» ($p=0,07$).

Среди детей группы «ЛТИ» основное диагностическое значение для латентной туберкулезной инфекции имела реакция при стимуляции Rv2660c. Также для детей данной группы информативна была реакция при стимуляции антигеном ESAT6. По результатам ранжирования данные показатели имели наибольшее значение. Так, для Rv2660c средний ранг составил 4,3 ед, для ESAT6 – R 4,25, наименьшее значение имел показатель после индукции ESAT6-CFP10 – R 1,6.

Широко применяемые в настоящее время методы *in vivo* и *in vitro* для диагностики туберкулезной инфекции, по результатам метаанализа 2015 г., не позволяли дифференцировать латентную и активную [15]. По нашим исследованиям, для активной туберкулезной инфекции диагностическую значимость имел антиген ESAT6-CFP10 (при определении уровня ИФН- γ), положительные реакции отметили у 84% детей группы «ТБ» ($p=0,000$), при этом у детей группы «ЛТИ» положительных реакций не было зарегистрировано, что позволило рекомендовать включить данный антиген в комплекс специфического обследования для исключения ЛТИ у детей. Результаты теста после

стимуляции ППД-Л (по и.с.) оказались менее значимыми для оценки активности туберкулезной инфекции ($p=0,208$), несмотря на более выраженные реакции. Учитывая, что при отсутствии инфицирования МБТ регистрировались только отрицательные реакции на ППД-Л, тесты с ППД-Л можно рассматривать как скрининговые при отборе детей для необходимости дальнейшего специфического обследования.

Таким образом, проблема ранней диагностики туберкулезной инфекции у детей может быть решена при включении в диагностический алгоритм определения уровня ИФН- γ после индукции такими специфическими антигенами, как ППД-Л, ESAT6, Rv2660c, ESAT6-CFP10, и его комплексной оценке.

Заключение

Анализируя специфические антигены для ранней диагностики туберкулезной инфекции у детей, установили, что антигены ESAT6, Rv2660c являлись значимыми в диагностике латентной туберкулезной инфекции, а гибрид ESAT6-CFP10 – в диагностике туберкулеза. Для оценки напряженности специфического иммунитета сохранил свою значимость и туберкулин. Поэтому включение в комплекс диагностических мероприятий иммунологического теста по определению уровня ИФН- γ , индуцированного данными специфическими антигенами, позволит оптимизировать диагностику туберкулезной инфекции у детей для своевременного проведения профилактических мероприятий.

Список литературы

1. Лозовская М.Э. Сравнительный анализ результатов тестов *in vitro* «Квантиферон» и «Тубинферон» и кожной пробы с Диаскинтестом / М.Э. Лозовская [и др.] // Сборник тезисов II Конгресса национальной ассоциации фтизиатров. – СПб., 2013. – С. 111.
2. Пат. 2586279 Российская Федерация. МПК G01N 33/535 Способ оценки активности туберкулезной инфекции у детей и подростков / М.А. Плеханова [и др.]; ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (RU). — № 2015124784/15; заяв. 24.06.2015; опубл. 10.06.2016. – Бюл. № 16. – 10 с.
3. Плеханова М.А. Проба Манту с 2 ТЕ ППД-Л и/или проба с Диаскинтестом? / М.А.Плеханова // Сборник материалов XVII Конгресса педиатров России с международным участием «Актуальные проблемы педиатрии», Москва, 14–16 февраля 2014 г. – М., 2014. — С. 259.
4. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению латентной туберкулезной инфекции у детей. – М.: РООИ «Здоровье человека», 2015. – 36 с.

5. Фтизиатрия. Национальное руководство: с прил. на компакт-диске / Ассоц. мед. о-в по качеству, Рос. о-во фтизиатров // под ред. М.И. Перельмана. — М.: Гэотар-Медиа, 2010. — 504 с. : ил.
6. Al-Zamel, F.A. Detection and diagnosis of Mycobacterium tuberculosis / F.A. Al-Zamel // *Expert Rev Anti Infect Ther.* — 2009. — Vol. 7, № 9. — P. 1099–1108.
7. Andersen, P. The prognosis of latent tuberculosis: can disease be predicted? // P. Andersen [et al.] // *Trends. Mol. Med.* — 2007. — Vol. 13, № 5. — P. 175–182.
8. Byun E.-H. Mycobacterium tuberculosis Rv0577, a novel TLR2 agonist, induces maturation of dendritic cells and drives Th1 immune response / E.-H.Byun, [et al.] // *FASEB J.* — 2012. — V. 26. — P. 2695–2711.
9. Ehlers S. The granuloma in tuberculosis: dynamics of a host–pathogen collusion / Stefan Ehlers, Ulrich E. Schaible // *Frontiers in Immunology.* — January, 2013. — Vol. 3, Article 411. — P. 1–9.
10. Gamma Interferon Release Assays for Detection of Mycobacterium tuberculosis Infection / Madhukar Pai [et al.] // *Clinical Microbiology Reviews.* — January, 2014. — Vol. 27, № 1. — P. 3–20.
11. Huard R. C. The Mycobacterium tuberculosis complex-restricted gene CFP32 encodes an expressed protein that is detectable in tuberculosis patients and is positively correlated with pulmonary interleukin-10. / R.C. Huard [et al.] // *Infect. Immun.* — 2003. — Vol. 71. — P. 6871–6883.
12. Mustafa, A.S. Immunogenicity of Mycobacterium tuberculosis RD1 region gene products in infected cattle / A.S. Mustafa [et al.] // *Clin. Experim. Immunol.* — 2002. — Vol. 130. № 1. — P. 37–42.
13. Pinto L.M. Immunodiagnosis of tuberculosis: State of the Art / L.M. Pinto, J. Grenier, S.G. Schumacher // *Med. Princ. Pract.* — 2012. — № 21. — P. 4–13.
14. T cells and adaptive immunity to Mycobacterium tuberculosis in humans / L.D. Jasenosky [et al.] // *Immunol. Rev.* — 2015, Mar. — № 264(1). — P. 74–87.
15. Venturini E. What steps do we need to take to improve diagnosis of tuberculosis in children? / E. Venturini, G. Remaschi, E. Berti // *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* — 2015, Jul. — № 13 (7). — P. 907–922.