

ОЦЕНКА СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИГЕНОВ РАННЕЙ СТАДИИ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ

М. А. ПЛЕХАНОВА¹, В. А. АКСЕНОВА², А. П. ТКАЧУК³, Ю. И. ПАЦУЛА⁴, Л. А. КРИВЦОВА¹, А. Н. КОЛОМЕЕЦ⁴

¹ГБОУ ВПО «Омский государственный медицинский университет» МЗ РФ, г. Омск

²НИИ фтизиопульмонологии ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова» МЗ РФ, Москва

³ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, Москва

⁴Сибирский Федеральный окружной центр по профилактике и борьбе со СПИД ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора, г. Омск

Для повышения информативности методов ранней диагностики туберкулезной инфекции продолжаются поиски более специфических антигенов. С целью оценки белков микобактерий туберкулеза (МБТ) (ППД-Л, ESAT 6, 85, гибрид ESAT 6 CFP 10, CFP32B, Rv2660c) проведено исследование, включающее определение индуцированного ИФН- γ у детей, больных туберкулезом, в раннем периоде первичной туберкулезной инфекции, а также не инфицированных МБТ – 130 детей в возрасте $6,0 \pm 0,4$ года. Установили, что туберкулин сохранил свою значимость для оценки напряженности противотуберкулезного иммунитета. Антигены ESAT 6, 85, CFP32B, Rv2660c определили как белки ранней стадии туберкулезной инфекции. Сохранение ответа при стимуляции данными антигенами у больных характеризовало благоприятное течение туберкулеза. Антигены ESAT 6 и Rv2660c являлись значимыми в оценке латентной туберкулезной инфекции, а гибрид ESAT 6 CFP 10 – в диагностике туберкулеза. Поэтому включение иммунологических тестов (*in vitro*) в комплекс диагностических мероприятий позволит оптимизировать раннюю диагностику туберкулезной инфекции у детей, а при развитии туберкулеза – прогнозировать его течение.

Ключевые слова: дети, специфические антигены, туберкулезная инфекция, диагностика.

EVALUATION OF SPECIFIC ANTIGENS AT THE EARLY STAGE OF TUBERCULOUS INFECTION IN CHILDREN

M. A. PLEKHANOVA¹, V. A. AKSENOVA², A. P. TKACHUK³, YU. I. PATSULA⁴, L. A. KRIVTSOVA¹, A. N. KOLOMEETS⁴

¹Omsk State Medical University, Omsk, Russia

²Research Institute of Phthisiopulmonology by I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

³Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

⁴Siberian Federal Regional Center on AIDS Prevention and Control, Omsk Research Institute of Natural Focal Infections, Omsk, Russia

More specific antigens are still being searched for in order to increase informativeness of techniques for early diagnostics of tuberculous infection. Aimed at the investigation of proteins of tuberculous mycobacteria (PPD-L, ESAT 6, 85, hybrid of ESAT 6 CFP 10, CFP32B, Rv2660c) the study was conducted including testing of induced IFN- γ in the children ill with tuberculosis in the early period of primary tuberculous infection and also those not infected with tuberculous mycobacteria – 130 children in the age from 6.0 ± 0.4 years old. It was found out that tuberculin remained to be valuable for evaluation of the intensity of anti-tuberculosis immunity. Antigens of ESAT 6, 85, CFP32B, Rv2660c were identified as proteins of the early stage of tuberculous infection. The presence of response when stimulating by the above antigens was typical of the favorable course of tuberculosis. Antigens of ESAT 6 and Rv2660c were valuable for assessment of latent tuberculous infections and the hybrid of ESAT 6 CFP 10 – for diagnostics of tuberculosis. Therefore introduction of immunological tests (*in vitro*) into the set of diagnostic tools allows optimizing the early diagnostics of tuberculous infection in children and forecasting the course of the disease when tuberculosis has developed.

Key words: children, specific antigens, tuberculous infection, diagnostics.

Низкая информативность специфических проб для диагностики латентной туберкулезной инфекции у детей [3, 5] требует поиска более чувствительных антигенов, в том числе полученных генно-инженерным путем [6]. Среди нескольких групп антигенов *M. tuberculosis* (МБТ) с протективной активностью центральное место занимают секретлируемые белки [12].

В результате недавних исследований у лиц, инфицированных МБТ, был выявлен белок CFP32B (Rv0577) [10]. Данные исследования показали, что белок мог регулировать врожденный и адаптивный иммунитет, взаимодействуя с TLR2. CFP32B активировал Т-клетки, секретирующие ИФН- γ и ИЛ-2, что, возможно, способствовало формированию

Th1-иммунного ответа и развитию эффекторных Т-клеток памяти [7, 10].

Группа ученых под руководством профессора П. Андерсена (2011) обнаружила шесть генов, экспрессия которых не зависела от стадии инфекции, и продуктом одного из этих генов являлся белок Rv2660c, при этом сам по себе белок Rv2660c обладал низкой иммуногенной активностью и считался белком латентной стадии туберкулезной инфекции [1, 8].

Таким образом, определение недавно идентифицированных белков микобактерий (CFP 32B, Rv2660c) может быть перспективным для диагностики латентной туберкулезной инфекции у детей.

Цель исследования: оценка влияния белков микобактерий туберкулеза на уровень индуцированного гамма-интерферона у детей с туберкулезной инфекцией.

Материалы и методы

В исследование включено 130 детей в возрасте от 1 года до 17 лет. Часть детей ($N = 130$, $n = 58$; 44,6%) была госпитализирована в Специализированную туберкулезную детскую клиническую больницу г. Омска в 2014 г. с подтвержденным диагнозом туберкулеза (группа «ТБ»). Среди детей с диагнозом туберкулеза в 22,4% ($N = 58$, $n = 13$) случаев установили инфильтративный, в 1,7% ($N = 58$, $n = 1$) – диссеминированный и в 1,7% ($N = 58$, $n = 1$) – туберкулезный плеврит, в 37,9% ($N = 58$, $n = 22$) – первичный туберкулезный комплекс и в 36,2% ($N = 58$, $n = 21$) – туберкулез внутригрудных лимфатических узлов, в том числе в фазе инфильтрации – у 75,9% пациентов ($N = 58$, $n = 44$), в фазе распада – у 6,9% ($N = 58$, $n = 4$), в фазе обсеменения – у 1,7% ($N = 58$, $n = 1$) и кальцинации – у 15,5% ($N = 58$, $n = 9$).

В амбулаторных условиях было обследовано 55,4% ($N = 130$, $n = 72$) детей, из них 40,3% ($N = 72$, $n = 29$) пациентов не были инфицированы МБТ (группа «НТ»), при этом в 69% ($N = 29$, $n = 20$) наблюдений установили поствакцинальную аллергию. У 59,7% ($N = 72$, $n = 43$) пациентов был установлен ранний период первичной туберкулезной инфекции (группа «РППТИ»).

Диагноз туберкулеза основывался на результатах клинических, лабораторных, в том числе бактериологических (бактериоскопия на КУМ – окраска по Цилю – Нильсену, посев на МБТ – на жидкие среды системы Vactec 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. Учитывали результаты туберкулинодиагностики и пробы с диаскинтестом.

Дополнительно всем детям было проведено специфическое иммунологическое исследование, включавшее определение уровня ИФН- γ после индукции специфическими антигенами (ППД-Л, СFP32В, Rv2660с, ESAT 6, 85, гибрид ESAT 6 и СFP 10). Оценку уровня индуцированного ИФН- γ проводили по определению индекса стимуляции (и. с.) и в пг/мл [4].

На проведение данного исследования получено разрешение этического комитета Омской государственной медицинской академии (2012). Для участия детей в иммунологическом исследовании от родителей или их законных представителей получено добровольное информированное согласие.

Для анализа и оценки полученных данных использовали методы описательной статистики. Достоверность различий между группами определяли с помощью непараметрических критериев Манна – Уитни (U), Краскела – Уоллиса (H) и критерия хи-квадрат (χ^2). Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Полученные данные обрабатывали с использованием статистических программ Statistica 6,0 и Biostat.

Результаты исследования

Средний возраст детей, включенных в исследование, составил $6,0 \pm 0,4$ года, девочек было 46,9% ($N = 130$, $n = 61$) и мальчиков – 53,1% ($N = 130$, $n = 69$). Половина детей была из социально-благополучных семей ($N = 130$, $n = 77$, 59,2%). Из социально-неблагополучных семей в основном были дети с установленным диагнозом туберкулеза ($p = 0,000$) (табл. 1), также чаще эти дети были из семейного очага туберкулеза ($p = 0,000$) и очага с бактериовыделением ($p = 0,000$). Основная часть детей, включенных в исследование, была привита при рождении вакциной БЦЖ ($N = 130$, $n = 121$, 93,1%). Среди не инфицированных МБТ каждый четвертый ребенок не привит в связи с отказом родителей от вакцинации или наличием противопоказаний ($p = 0,000$). Среди привитых детей отметили высокую результативность противотуберкулезной вакцинации (формирование рубца 4-10 мм и поствакцинальной аллергии) у 39,7% ($p = 0,966$).

Всем детям были проведены специфические пробы *in vivo*: Манту с 2 ТЕ ППД-Л и с диаскинтестом. По результатам туберкулинодиагностики косвенно судили об уровне специфического иммунитета, по реакции на диаскинтест – об активности специфического процесса. Среди больных туберкулезом уровень чувствительности к туберкулину был достоверно выше, чем среди детей в раннем периоде первичной туберкулезной инфекции и не инфицированных МБТ ($p < 0,05$). В одном случае регистрировали отрицательную энергию у ребенка с инфильтративным туберкулезом легких в фазе распада и обсеменения с доказанным бактериовыделением (МБТ+). При оценке результатов пробы Манту с 2 ТЕ ППД-Л у больных туберкулезом среди положительных реакций на туберкулин чаще регистрировались гиперергические ($p = 0,031$). При оценке чувствительности к диаскинтесту были отмечены статистически значимые различия по уровню ответа к рекомбинантному аллергену среди больных туберкулезом детей, в раннем периоде первичной туберкулезной инфекции и детей, не инфицированных МБТ ($p < 0,0001$). Полученные результаты свидетельствовали о высокой информативности теста для диагностики туберкулеза (специфичность – 81,8%, чувствительность – 92%, доля истинных результатов – 88,9%). Среди больных туберкулезом отрицательные результаты пробы с

Таблица 1. Социально-эпидемиологическая характеристика детей исследуемых групп**Table 1. Social and epidemiological characteristics of the children from the studied groups**

Признаки	ТБ, n = 58	РППТИ, n = 43	НТ, n = 29	χ^2, p
	абс. (%)	абс. (%)	абс. (%)	
Пол: женский	29 (50)	20 (46,5)	13 (44,8)	$\chi^2 = 0,243, p = 0,885$
мужской	29 (50)	23 (53,5)	16 (55,2)	
Семья: социально-сохранная	18 (31)	40 (93)	19 (65,5)	$\chi^2 = 42,782, p = 0,000$
социально-дезадаптированная	24 (41,4)	2 (4,7)	3 (10,4)	
социопатическая	16 (27,6)	1 (2,3)	7 (24,1)	
Контакт с больным туберкулезом	37 (63,8)	3 (7)	3 (10,3)	$\chi^2 = 44,723, p = 0,000$
Семейный контакт	28 (48,3)	2 (4,7)	2 (6,9)	$\chi^2 = 31,640, p = 0,000$
Контакт с больным с бактериовыделением	32 (55,2)	2 (4,7)	2 (6,9)	$\chi^2 = 39,538, p = 0,000$
Вакцинация БЦЖ	57 (98,3)	42 (97,7)	22 (75,9)	$\chi^2 = 17,181, p = 0,000$
Результативность вакцинации БЦЖ: формирование рубца (4-10 мм) и ПВА	23 (40,4)	16 (38,1)	9 (40,9)	$\chi^2 = 0,069, p = 0,966$

Примечание: здесь и далее ТБ – туберкулез органов дыхания; РППТИ – ранний период первичной туберкулезной инфекции; НТ – не инфицирован МБТ; ПВА – поствакцинальная аллергия.

диаскинтестом регистрировали в одном случае при отрицательной анергии (инфильтративный туберкулез), во втором – у ребенка с ВИЧ-инфекцией, ассоциированной с диссеминированным туберкулезом (МБТ+). У большей части детей, больных туберкулезом, отметили гиперергические реакции на диаскинтест ($p < 0,05$).

Результаты исследования спонтанной продукции ИФН- γ в цельной крови представлены в табл. 2. При сравнении полученных показателей уровня спонтанной продукции ИФН- γ статистически значимых различий среди исследуемых групп не выявили, что свидетельствовало о низкой диагностической информативности данного исследования, в том числе для оценки активности туберкулезной инфекции.

Таблица 2. Уровень спонтанной продукции ИФН- γ в цельной крови у детей исследуемых групп (пг/мл)**Table 2. Level of spontaneous production of IFN- γ in the whole blood of children from the studied groups (pg/ml)**

Исследуемые группы	ИФН- γ спон., пг/мл	Критерий Краскела – Уоллиса (H), p
	МЕ ($Q_{25\%} : Q_{75\%}$)	
ТБ, n = 58	15,2 (9,7 : 14,8)	H = 0,793; p = 0,673
РППТИ, n = 43	12,9 (9,1 : 13,1)	
НТ, n = 29	11,7 (9,3 : 14,2)	

Уровень продукции индуцированного ИФН- γ (пг/мл) в специфических тестах *in vitro* представлен в табл. 3. Индукция проведена ранее изученными белками МБТ (ППД-Л, ESAT 6, 85, гибрид ESAT 6 CFP 10) и недавно идентифицированными белками микобактерий (CFP32В, Rv2660с).

Для оценки туберкулезной инфекции туберкулин (ППД-Л) сохранил значимость в качестве индуктора (митогена). Так, среди детей, больных туберкулезом, уровень ИФН- γ (пг/мл) статистически значимо отличался от показателей детей в раннем периоде туберкулезной инфекции ($p = 0,009$) и детей, не инфицированных МБТ ($p = 0,001$). При определении индекса стимуляции установили статистически значимые различия в исследуемых группах ($p = 0,000$): среди детей, не инфицированных МБТ, и. с. = 2,2; $Q_{25\%} : Q_{75\%}$ 0,2 : 1,9; больных туберкулезом – 29,8 ($Q_{25\%} : Q_{75\%}$ 9,3 : 31,6; $p_{\text{НТ-ТБ}} = 0,000$); в раннем периоде первичной туберкулезной инфекции – 17,7 ($Q_{25\%} : Q_{75\%}$ 3,6 : 21,8; $p_{\text{НТ-РППТИ}} = 0,0003$; $p_{\text{ТБ-РППТИ}} = 0,033$).

В настоящее время широко применяются диагностические тесты, где в качестве индуктора используется рекомбинантный белок ESAT 6 CFP 10. Так, первые же данные по препарату диаскинтест показали его высокую, почти 100%-ную специфичность, а положительные реакции на ESAT 6 CFP 10 не свя-

Таблица 3. Уровень индуцированной продукции ИФН- γ в цельной крови у детей исследуемых групп (пг/мл)**Table 3. Level of induced production of IFN- γ in the whole blood of children from the studied groups (pg/ml)**

Антигены	ТБ, n = 58	РППТИ, n = 43	НТ, n = 29	Критерий Краскела – Уоллиса (H), p
	МЕ ($Q_{25\%} : Q_{75\%}$)	МЕ ($Q_{25\%} : Q_{75\%}$)	МЕ ($Q_{25\%} : Q_{75\%}$)	
ППД-Л, пг/мл	2 475,2 (750 : 3 150)	1 053,4 (420 : 1 180)	126,1 (7,2 : 83,3)	H = 52,044; p = 0,000
ESAT 6, пг/мл	52,0 (2,9 : 51,5)	267,5 (23 : 254,5)	50,1 (3,5 : 60)	H = 13,930; p = 0,001
85, пг/мл	44,8 (3,6 : 30)	183,0 (10,5 : 200)	87,5 (9,9 : 21,5)	H = 8,990; p = 0,011
гибрид ESAT 6 CFP 10, пг/мл	361,0 (55 : 430)	137,5 (8,1 : 57,5)	12,6 (1,7 : 14,1)	H = 35,543; p = 0,000
CFP32В, пг/мл	59,3 (5 : 92)	258,3 (11,1 : 337)	83 (4,8 : 79)	H = 8,480; p = 0,014
Rv2660с, пг/мл	100,9 (7,9 : 85)	430,1 (110 : 531)	107,3 (6,3 : 103)	H = 30,501; p = 0,000

зывали с латентным микробизмом [2]. В настоящем исследовании, оценивая результаты индукции гибридного белка (ESAT 6 CFP 10), установили статистически значимые различия между показателями уровня индуцированного ИФН- γ как в абсолютных цифрах (пг/мл) ($p = 0,000$), так и по и. с.: у детей, больных туберкулезом, и. с. = 5,9; $Q_{25\%} : Q_{75\%}$ 0,8 : 6,9; в раннем периоде первичной туберкулезной инфекции и. с. = 2,4; $Q_{25\%} : Q_{75\%}$ 0,1 : 1; $p_{\text{ТБ-РППТИ}} = 0,018$; не инфицированных МБТ и. с. = 0,3; $Q_{25\%} : Q_{75\%}$ 0,1 : 0,3; $p_{\text{НТ-ТБ}} = 0,0004$; $p_{\text{НТ-РППТИ}} = 0,044$. Полученные результаты подтверждали информативность данного митогена для определения активности туберкулезной инфекции.

Проводя оценку уровня ИФН- γ после индукции также хорошо изученного ESAT 6, входящего в состав гибридного белка, установили статистически значимые различия в исследуемых группах ($p = 0,001$). Показатель и. с. индуцированного ИФН- γ был ниже у больных туберкулезом (и. с. = 0,8; $Q_{25\%} : Q_{75\%}$ 0,04 : 1) и детей, не инфицированных МБТ (и. с. = 1,2; $Q_{25\%} : Q_{75\%}$ 0,2 : 1,8; $p_{\text{ТБ-НТ}} = 0,290$), при этом достоверно выше в раннем периоде первичной туберкулезной инфекции (и. с. = 5,0; $Q_{25\%} : Q_{75\%}$ 0,6 : 5,6; $p_{\text{ТБ-РППТИ}} = 0,000$; $p_{\text{НБ-РППТИ}} = 0,039$). Не установлено взаимосвязи между уровнем ИФН- γ индуцированного ESAT 6 и после индукции как туберкулином ($r = -0,09$), так и гибридным белком ($r = 0,01$). Результаты исследования подтвердили, что белок ESAT 6 можно рассматривать как белок ранней стадии развития туберкулезной инфекции. При этом по результатам исследования ESAT 6 в сочетании с CFP 10 информативен в период развития заболевания, что позволило гибридный белок рассматривать как белок поздней стадии развития туберкулезной инфекции.

Результаты ИФН- γ после индукции антигеном 85 (пг/мл) в исследуемых группах статистически различались ($p = 0,011$). При оценке результатов и. с. установили, что антиген 85 (являясь ранним белком) регистрировался и у детей с поствакцинальной аллергией (в группе не инфицированных МБТ), что снижало его информативность для ранней стадии туберкулезной инфекции ($p = 0,544$).

Единичные публикации о специфическом антигене CFP32В противоречивы, поэтому до конца не ясна роль данного белка [7, 10, 11]. Ряд исследователей предполагают, что данный белок участвует в формировании клеточного иммунного ответа. Данное предположение позволило рассматривать антиген как белок ранней стадии туберкулезной инфекции [7], что нашло отражение и в результатах настоящего исследования. Установлен высокий уровень ИФН- γ после индукции CFP32В у пациентов в раннем периоде первичной туберкулезной инфекции (и. с. = 5,0; $Q_{25\%} : Q_{75\%}$ 0,2 : 7,7), который статистически значимо отличался от уровня индуцированного ИФН- γ у детей, больных туберкулезом (и. с. = 0,9; $Q_{25\%} : Q_{75\%}$ 0,1 : 1,6; $p = 0,000$). При

этом отсутствовали различия между показателями уровня индуцированного ИФН- γ у детей, не инфицированных МБТ (с поствакцинальной аллергией) (и. с. = 2,0; $Q_{25\%} : Q_{75\%}$ 0,2 : 1,7), и больных туберкулезом ($p = 0,085$), не инфицированных МБТ, и в раннем периоде первичной туберкулезной инфекции ($p = 0,097$), что снижало значимость CFP32В как белка ранней стадии туберкулезной инфекции. Не выявили зависимости между показателями ИФН- γ индуцированного CFP32В и ППД-Л ($r = 0,04$), а также гибридным белком ESAT 6 CFP 10 ($r = -0,05$). При этом определялась прямая сильная зависимость между уровнем ИФН- γ после индукции ESAT 6 и CFP32В ($r = 0,80$). Следовательно, CFP32В можно рассматривать как белок ранней стадии туберкулезной инфекции, однако он малоинформативен в качестве специфического антигена для оценки латентной туберкулезной инфекции у детей.

По результатам исследования установили также высокий уровень ИФН- γ при индукции Rv2660с у пациентов в раннем периоде первичной туберкулезной инфекции, и. с. составил $7,3 \pm 1,4$ ($Q_{25\%} : Q_{75\%}$ 1,8 : 7,6), который статистически значимо отличался от показателей у больных туберкулезом (и. с. $1,6 \pm 0,4$; $Q_{25\%} : Q_{75\%}$ 0,1 : 1,3; $p = 0,000$) и не инфицированных МБТ детей (и. с. $2,4 \pm 1,0$; $Q_{25\%} : Q_{75\%}$ 0,6 : 1,8; $p = 0,013$). Полученные данные согласуются с результатами исследований Н. Не, Н. Yang, Y. Deng (2015), которые показали, что Rv2660с способен вызвать заметную реакцию клеточного иммунитета и гуморального иммунитета, при этом наиболее сильный индуцированный ответ регистрировался среди пациентов с латентной туберкулезной инфекцией [9]. Результаты подтверждали значимость Rv2660с как белка ранней стадии туберкулезной инфекции. Установили обратную умеренную зависимость между уровнем ИФН- γ индуцированного ППД-Л и Rv2660с, коэффициент по Спирмену составил $r = -0,30$, $p = 0,058$, и отсутствие корреляции между показателями ИФН- γ при индукции гибридным белком ESAT 6 CFP 10 и Rv2660с ($r = 0,048$, $p = 0,793$). Определяя корреляцию между показателем (и. с.), полученным после индукции белком ранней стадии развития туберкулезной инфекции ESAT 6, и показателем ИФН- γ после индукции Rv2660с установили статистически значимую умеренную зависимость ($r = 0,396$, $p = 0,005$). Также определили, что существовала прямая статистически значимая умеренная зависимость между показателями ИФН- γ после индукции Rv2660с и CFP32В ($r = 0,561$, $p = 0,00002$). Полученные результаты позволили отнести белок Rv2660с, так же как и белок CFP32В, к белку ранней стадии туберкулезной инфекции, при этом Rv2660с высокоинформативен в качестве специфического антигена для оценки латентной туберкулезной инфекции у детей.

Учитывая полученные данные, провели оценку специфического теста (определение уровня ИФН- γ

после индукции Rv2660c) для диагностики латентной туберкулезной инфекции. Специфичность составила 96,6% при чувствительности 90,7%, доля истинных результатов зарегистрирована в 93,1% случаев. Комплексная оценка специфических иммунологических тестов (с белками ранней стадии туберкулезной инфекции: ESAT 6, Rv2660c) для диагностики латентной туберкулезной инфекции позволила повысить информативность теста на 1,3% (специфичность – 96,6%, чувствительность – 93%, доля истинных результатов – 94,4%).

Анализ данных позволил рассмотреть диагностическую значимость изучаемых специфических антигенов в комплексе. Так, среди детей из группы больных туберкулезом основное диагностическое значение имели результаты при оценке ИФН-γ после стимуляции гибридным белком ESAT 6 CFP 10 (рис. 1). При проведении кластерного анализа по

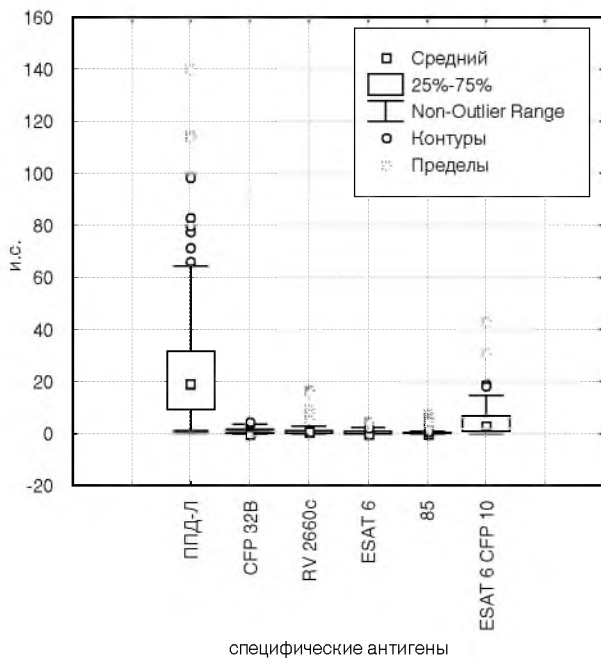


Рис. 1. Уровень ИФН-γ, индуцированного специфическими антигенами, у детей группы ТБ (и.с.)

Fig. 1. Level of IFN-γ induced by specific antigens in the children from TB group (i.s.)

результатам оценки ИФН-γ, индуцированного специфическими антигенами, в группе детей, больных туберкулезом, было выделено 3 кластера (рис. 2). Первый кластер сформирован по результатам оценки ИФН-γ, индуцированного специфическими антигенами, у детей, больных туберкулезом первичного генеза, второй кластер – при формировании вторичных форм туберкулеза и третий – при развитии анергии. Для первого кластера статистически значимыми были более выраженные реакции на ранние белки: ESAT 6 ($F = 61,307; p = 0,000$), CFP32B ($F = 53,814; p = 0,000$), 85 ($F = 26,060; p = 0,000$), Rv2660c ($F = 21,826; p = 0,000$) и менее выражен-

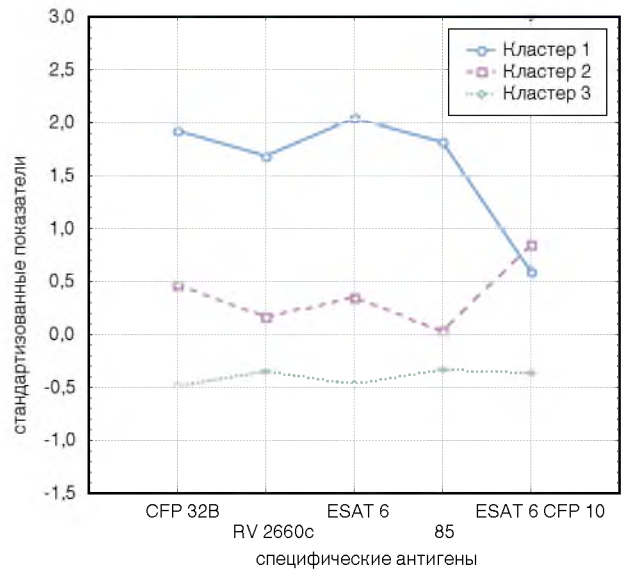


Рис. 2. Кластерный анализ по стандартизованным показателям ИФН-γ, индуцированного специфическими антигенами, у детей группы ТБ

Fig. 2. Cluster analysis as per standardized rates of IFN-γ induced by specific antigens in the children from TB group

ные реакции на гибридный белок ESAT 6 CFP 10 ($F = 10,155; p = 0,0001$). Учитывая, что среди детей с первичными формами туберкулеза (ТВЛУ, ПТК) не регистрировали осложнений заболевания и бактериовыделения, течение специфического процесса рассматривали как благоприятное, в связи с этим регистрация положительных реакций на антигены ранней стадии туберкулезной инфекции свидетельствовала о благоприятном течении специфического процесса, а снижение ответа – о его неблагоприятном течении, что может быть прогностическим критерием при развитии туберкулеза.

Среди детей в раннем периоде первичной туберкулезной инфекции основное диагностическое значение имело повышение уровня ИФН-γ после стимуляции двумя антигенами Rv2660c и ESAT 6 (рис. 3). Среди детей, не инфицированных МБТ, значимых реакций не зарегистрировано.

Заключение

Оценивая белки микобактерий туберкулеза в специфических тестах *in vitro*, установили, что туберкулин сохранил свою значимость для оценки напряженности противотуберкулезного иммунитета. Антигены ESAT 6, 85, CFP32B, Rv2660c определили как белки ранней стадии туберкулезной инфекции. Сохранение ответа при стимуляции данными антигенами у больных туберкулезом характеризовало благоприятное течение заболевания. Антигены ESAT 6 и Rv2660c являлись значимыми в оценке латентной туберкулезной инфекции при двукратном повышении индекса стимуляции уровня ИФН-γ или при уровне индуцированного ИФН-γ

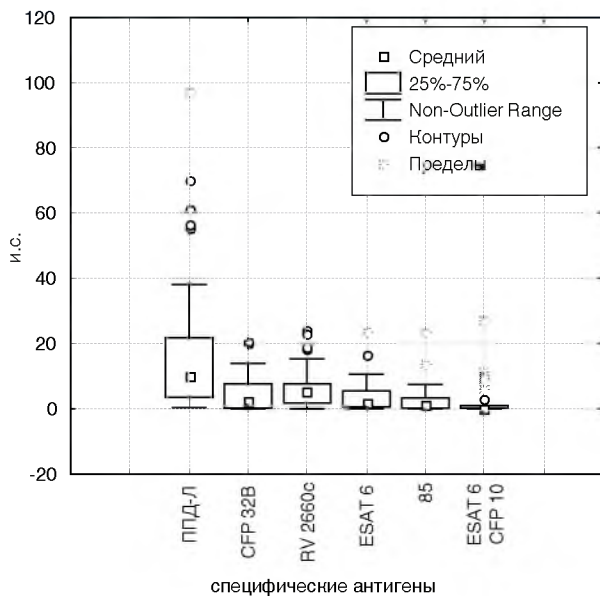


Рис. 3. Уровень ИФН- γ , индуцированного специфическими антигенами, у детей группы РППТИ (и. с.)

Fig. 3. Level of IFN- γ induced by specific antigen ins the children from the group of early period of tuberculous infection. (i.s.)

ЛИТЕРАТУРА

1. Джонсон М. Новая вакцина H56 способна бороться с латентной туберкулезной инфекцией // *Материалы и методы*. – 2011. – № 1. – С. 45. – <http://www.labome.ru/method/New-Tuberculosis-Vaccine-Fights-Latent-TB-Infection.html><http://dx.doi.org/10.13070/mm.ru.1.45>
2. Кожная проба с препаратом «Диаскинтест» – новые возможности идентификации туберкулезной инфекции / Под ред. акад. РАН и РАМН М. А. Пальцева. 2-е изд., перераб., дополн. – М.: Шико, 2011. – 256 с.: ил.
3. Лозовская М. Э. и др. Сравнительный анализ результатов тестов *in vitro* «Квантиферон» и «Тубинферон» и кожной пробы с Диаскинтестом // *Сб. тезисов II Конгресса Национальной ассоциации фтизиатров.* – СПб., 2013. – С. 111.
4. Пацула Ю. И., Плеханова М. А. и др. Пат. 2498311 Российская Федерация. МПК G01N 33/53 Способ оценки активности туберкулеза у детей и подростков; Омская государственная медицинская академия (RU). – № 2011110673/15; заяв. 21.03.2011 г.; опубл. 10.11.2013 г. – *Бюл.* № 31. – 9 с.
5. Плеханова М. А. Проба Манту с 2 ТЕ ППД-Л и/или проба с Диаскинтестом // *Сб. материалов XVII Конгресса педиатров России с международным участием «Актуальные проблемы педиатрии»*, Москва, 14-16 февраля 2014 г. – М., 2014. – С. 259.
6. Al-Zamel F.A. Detection and diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* // *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* – 2009. – Vol. 7, № 9. – P. 1099-1108.
7. Byun E.-H. et al. *Mycobacterium tuberculosis* Rv0577, a novel TLR2 agonist, induces maturation of dendritic cells and drives Th1 immune response // *FASEB J.* – 2012. – Vol. 26. – P. 2695-2711.
8. Ehlers S., Schaible U. E. The granuloma in tuberculosis: dynamics of a host-pathogen collusion / Stefan Ehlers // *Front. Immunol.* – 2013. – Vol. 3, Article 411. – P. 1-9.
9. He H., Yang H., Deng Y. *Mycobacterium tuberculosis* dormancy-associated antigen of Rv2660c induces stronger immune response in latent *Mycobacterium tuberculosis* infection than that in active tuberculosis in a Chinese population // *Europ. J. Clin. Microbiol. Infect. Diseases.* – 2015. – Vol. 34, № 6. – P. 1103-1109.
10. Huard R. C. et al. 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 // *Infect. Immun.* – 2003. – Vol. 71, № 12. – P. 6871-6883.
11. Moser M., Murphy K. M. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development // *Nat. Immunol.* – 2000. – № 1. – P. 199-205.
12. Mustafa A. S. et al. Immunogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* RD1 region gene products in infected cattle // *Clin. Experim. Immunol.* – 2002. – Vol. 130, № 1. – P. 37-42.

REFERENCES

ESAT 6 более 60 пг/мл и Rv2660c более 100 пг/мл. Гибридный белок ESAT 6 CFP 10 имел основное значение в оценке туберкулеза при уровне ИФН- γ более 55 пг/мл.

Таким образом, включение иммунологических тестов (*in vitro*) для определения ИФН- γ , индуцированного специфическими антигенами, в комплекс диагностических мероприятий позволит оптимизировать диагностику латентной туберкулезной инфекции у детей, а при выявлении туберкулеза – прогнозировать его течение.

1. Johnson M. New vaccine of H56 can control the latent tuberculous infection. *Materials and Methods*, 2011, no. 1, pp. 45. (In Russ.) – <http://www.labome.ru/method/New-Tuberculosis-Vaccine-Fights-Latent-TB-Infection.html><http://dx.doi.org/10.13070/mm.ru.1.45>
2. *Kochnaya proba s preparatom Diaskintest – novye vozmozhnosti identifikatsii tuberkuleznoy infektsii*. [Skin test with the use of Diaskintest – new opportunities for tuberculous infection identification]. Edited by M.A. Paltsev, 2nd edition, reviewed and supplemented. M., Shiko Publ., 2011, 256 p.
3. Lozovskaya M.E. et al. Comparative analysis of *in vitro* test results of Kvantiferon and Tubinferon and the skin test of Diaskintest. *Sb. tezisov II Kongressa Natsionalnoy assotsiatsii ftiziatrov*. [Abst. Book of the IInd Congress of National Association of Phthisiologists]. St. Petersburg, 2013, pp. 111. (In Russ.)
4. Patsula Yu.I., Plekhanova M.A. et al. *Sposob otsenki aktivnosti tuberkuleza u detey i podrostkov*. [Technique for tuberculosis activity assessment in children and adolescents]. RF Patent 2498311. 9 p.
5. Plekhanova M.A. Mantoux test with 2TU PPD-L and/or Diaskintest? *Sb. materialov XVII Kongressa pediatrov Rossii s mezhduнародnym uchastiem «Aktualnye problemy pediatrii»*. [Abst. book of the XVIIth Congress of Russian Pediatricians on Actual Pediatric Issues with international participation]. February 14-16, 2014, Moscow, 2014, pp. 259. (In Russ.)
6. Al-Zamel F.A. Detection and diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, 2009, vol. 7, no. 9, pp. 1099-1108.
7. Byun E.H. et al. *Mycobacterium tuberculosis* Rv0577, a novel TLR2 agonist, induces maturation of dendritic cells and drives Th1 immune response. *FASEB J.*, 2012, vol. 26, pp. 2695-2711.
8. Ehlers S., Schaible U.E. The granuloma in tuberculosis: dynamics of a host-pathogen collusion / Stefan Ehlers., *Front. Immunol.*, 2013, vol. 3, Article 411, pp. 1-9.
9. He H., Yang H., Deng Y. *Mycobacterium tuberculosis* dormancy-associated antigen of Rv2660c induces stronger immune response in latent *Mycobacterium tuberculosis* infection than that in active tuberculosis in a Chinese population. *Europ. J. Clin. Microbiol. Infect. Diseases*, 2015, vol. 34, no. 6, pp. 1103-1109.
10. Huard R.C. et al. 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. *Infect. Immun.*, 2003, vol. 71, no. 12, pp. 6871-6883.
11. Moser M., Murphy K.M. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat. Immunol.*, 2000, no. 1, pp. 199-205.
12. Mustafa A.S. et al. Immunogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* RD1 region gene products in infected cattle. *Clin. Experim. Immunol.*, 2002, vol. 130, no. 1, pp. 37-42.

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

ГБОУ ВПО «Омский государственный медицинский университет» МЗ РФ,
644043, г. Омск, ул. Ленина, д. 12.
Тел.: 8 (3812) 36-16-47.
E-mail: pediatria-PDO@mail.ru

Плеханова Мария Александровна
доцент кафедры педиатрии ПДО.

Кривцова Людмила Алексеевна
заведующая кафедрой педиатрии ПДО.

Аксёнова Валентина Александровна
НИИ фтизиопульмонологии ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова» МЗ РФ,
заведующая отделом туберкулеза у детей и подростков, главный внештатный специалист детский фтизиатр МЗ РФ.
119991, Москва, ул. Труubeцкая, д. 8, стр. 2.
Тел.: 8 (495) 631-11-12.
E-mail: v.a.aksenova@mail.ru

Ткачук Артем Петрович
ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией трансляционной биомедицины отдела генетики и молекулярной биологии бактерий.
123098, Москва, ул. Гамалеи, д. 18.
Тел./факс: 8 (499) 193-30-01, 8 (499) 193-30-19.
E-mail: artem.p.tkachuk@gmail.commailto:info@gamaleya.org

Сибирский Федеральный окружной центр по профилактике и борьбе со СПИД ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора,
644080, г. Омск, просп. Мира, д. 7.

Пацула Юрий Иванович
старший научный сотрудник арбитражной лаборатории диагностики ВИЧ и оппортунистических инфекций.
Тел.: 8 (3812) 65-15-22.
E-mail: mail@oniipi.org

Коломеец Анна Николаевна
врач-бактериолог арбитражной лаборатории диагностики ВИЧ и оппортунистических инфекций, заведующая лабораторией молекулярной диагностики отдела природно-очаговых бактериальных зоонозов.
Тел.: 8 (3812) 65-15-27.
E-mail: arbitasfoc2@gmail.com

FOR CORRESPONDENCE:

Omsk State Medical University,
12, Lenina St., Omsk, 644043
Phone: +7 (3812) 36-16-47.
E-mail: pediatria-PDO@mail.ru

Maria A. Plekhanova
Associate Professor of Pediatric Department with Professional Development Training.

Lyudmila A. Krivtsova
Head of Pediatric Department with Professional Development Training.

Valentina A. Aksenova
Research Institute of Phthiopulmonology by I.M. Sechenov First Moscow State Medical University,
Head of Department for Tuberculosis in Children and Adolescents, Chief External Children Phthisiologist.
8, Bd. 2, Trubetskaya St., Moscow, 119991.
Phone: +7 (495) 631-11-12.
E-mail: v.a.aksenova@mail.ru

Artem P. Tkachuk
Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Leading Researcher, Head of Laboratory of Translational Biomedicine by Department of Genetics and Molecular Biology of Bacteria .
18, Gamaleya St., Moscow, 123098
Phone/Fax: +7 (499) 193-30-01; +7 (499) 193-30-19.
E-mail: artem.p.tkachuk@gmail.commailto:info@gamaleya.org

Siberian Federal Regional Center on AIDS Prevention and Control, Omsk Research Institute of Natural Focal Infections,
7, Mira Ave., Omsk, 644080

Yury I. Patsula
Senior Researcher of Arbitral Laboratory for Diagnostics of HIV and Opportunistic Infections.
Phone: +7 (3812) 65-15-22.
E-mail: mail@oniipi.org

Anna N. Kolomeets
Bacteriologist of Arbitral Laboratory for Diagnostics of HIV and Opportunistic Infections, Head of Molecular Diagnostics Laboratory of the Department for Natural Focal Bacterial Zoonoses.
Phone: +7 (3812) 65-15-27.
E-mail: arbitasfoc2@gmail.com

Поступила 29.02.2016

Submitted as of 29.02.2016