

© Коллектив авторов, 2009

Л.И. Мордовская¹, В.А. Аксенова¹, М.А. Владимирский¹, Е.И. Аксенова³,
Е.Е. Ефремов², Т.Н. Власик²

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ИНДУКЦИИ ИНТЕРФЕРОНА γ КЛЕТКАМИ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ IN VITRO В ПРИСУТСТВИИ АНТИГЕНОВ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА

¹НИИ фтизиопульмонологии ГОУ ВПО ММА им. И.М. Сеченова Росздрава; ²Российский кардиологический научный центр; ³НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалея, Москва

Ежегодно число впервые инфицированных микобактериями туберкулеза детей и подростков в России составляет 1,3% всего детского населения. Внутрикожная проба с туберкулином (проба Манту) остается основным методом выявления туберкулезной инфекции среди детей и подростков. Однако при массовой вакцинации и ревакцинации дифференцирование инфекционной от поствакциной аллергии связано с серьезными трудностями. Работа представляет результаты применения разработанной авторами российской тест-системы для определения туберкулезного инфицирования и дифференцирования его от поствакциной БЦЖ-аллергии на основе количественного анализа индукции интерферона γ в образцах цельной крови, инкубированных в течение 20–24 ч в присутствии туберкулина PPD и специфического для микобактерий туберкулеза рекомбинантного антигена ESAT-6. Чувствительность определения туберкулезного инфицирования составляет 94,2% при 100% специфичности.

Ключевые слова: туберкулез, детское население, иммунный ответ, интерферон γ , рекомбинантные антигены.

Yearly number of children and adolescents in Russia infected by *M. tuberculosis* for the first time is 1,3% of children population. Tuberculin skin test (Mantoux test) is the main method of tuberculous infection diagnosis in children and adolescents. However differentiation of infection and postvaccinal allergy is rather difficult because of mass vaccination and revaccination. Authors of present study outworked Russian test-system for determination of tuberculous contamination and its differentiation from postvaccinal BCG- allergy based of quantitative analysis of interferon γ induction in whole blood specimens incubated during 20–24 h in presence of PPD tuberculin and recombinant ESAT-6 antigen, specific for *M. tuberculosis*. Results of this method usage showed its 94,2% sensitivity and 100% specificity.

Key words: tuberculosis, children population, immune response, interferon γ , recombinant antigens.

Число детей, впервые инфицированных микобактериями туберкулеза (МБТ), ежегодно составляет около 1,3 % всего детского населения страны [1]. Туберкулинодиагностика по-прежнему остается основным методом раннего выявления туберкулеза и формирования групп риска по заболеванию туберкулезом у детей [2]. Инфицированность МБТ определяется при конверсии («вираже») кожной туберкулиновой пробы Манту (ПМ) (переход результата туберкулинового кожного теста от отрицательного к положительному), которая должна

проводиться детям ежегодно. К 14 годам около 30% детского населения (всего 1 млн 300 тыс чел.) становятся инфицированными МБТ по результатам туберкулиновых проб. Однако эффективность этого метода диагностики первичной туберкулезной инфекции у детей недостаточна в связи с относительно низкой специфичностью ПМ. На каждые 1000 впервые инфицированных детей и подростков заболевает туберкулезом 12 детей и 100 подростков, что свидетельствует о поздней диагностике туберкулеза у части детей (особенно у подрост-

Контактная информация

Мордовская Лариса Ивановна – к. м. н., НИИ фтизиопульмонологии ГОУ ВПО ММА им. И.М. Сеченова Росздрава

Адрес: 127994, г. Москва, ул. Достоевского, 4

Тел.: (495) 631-33-14, E-mail: limordovskaya@mail.ru

Статья поступила 28.04.09, принята к печати 10.06.09

ков), о запоздалом выявлении виража туберкулиновой пробы [1].

В условиях массовой вакцинации БЦЖ (92–95% всех новорожденных) и ревакцинации в дошкольном и препубертатном возрастах довольно сложно достоверно установить уровень инфицированности детей МБТ, отличить поствакцидную аллергию, которая часто сохраняется в течение ряда лет, от инфекционной.

В связи с этим диагностика туберкулезной инфекции у детей, в том числе дифференцирование туберкулезного инфицирования детей от поствакцинной туберкулиновой аллергии, является одной из наиболее актуальных проблем детской фтизиатрии. Для специфической диагностики туберкулезной инфекции у детей, в отсутствие выраженных рентгенологических изменений, необходимо использовать новые методы, которые должны быть неинвазивными и не алергизирующими.

В последние годы в странах Европы и США тест-системы QuantiFERON-TB-Gold и QuantiFERON-TB-Gold In Tube, основанные на измерении иммунного ответа Т-лимфоцитов на микобактериальные антигены, выраженного продукцией интерферона γ (ИФН γ) в 24-часовой культуре цельной крови [3–5], рассматриваются в качестве тестов для определения туберкулезной инфекции. В этих тест-системах в качестве индукторов ИФН γ используются полученные генно-инженерным путем специфические для МБТ антигены: ESAT-6 (ранний секретлируемый антиген), CFP-10 (белок клеточного филтрат) и неспецифический стимулятор фитогемагглютинин. Эти антигены отсутствуют у микобактерий вакцинного штамма *M. bovis* (BCG) и большинства нетуберкулезных микобактерий. В связи со строгой специфичностью рекомбинантных антигенов предварительная вакцинация БЦЖ не оказывает значительного влияния на результаты индукции ИФН γ in vitro. Ряд исследователей отмечает важные преимущества этого метода по сравнению с кожной туберкулиновой пробой.

При использовании рекомбинантных антигенов ESAT-6 и CFP-10 этот тест был положительным при активной туберкулезной инфекции в 89% случаев, но отрицательным у БЦЖ-вакцинированных с минимальным риском туберкулезного контакта; специфичность – 98% [5].

Основной целью нашей работы явилось изучение уровня индукции ИФН γ клетками цельной крови in vitro в присутствии специфического антигена туберкулезного возбудителя у детей и подростков при первичной туберкулезной инфекции в сравнении с поствакцинной БЦЖ-аллергией.

Материалы и методы исследования

Обследованы 148 детей и подростков в возрасте от 1 до 14 лет, проходивших обследование и лечение в детском противотуберкулезном диспансере

г. Якутска и НИИ фтизиопульмонологии ММА им. И.М. Сеченова с установленными диагнозами: конверсия («вираж») туберкулиновой пробы – 52 пациента; поствакцинная аллергия – 40 пациентов; туберкулез внутригрудных лимфатических узлов – 25 пациентов. Обследовали также 31 здорового ребенка с отрицательной или сомнительной ПМ.

Поствакцидную аллергию, как и «вираж» туберкулиновой пробы устанавливали на основании данных о вакцинации, ревакцинации БЦЖ, динамики ПМ и эпидемиологического анализа. Для исследования были с согласия родителей или при проведении биохимических исследований взяты образцы по 3,0 мл крови с гепарином (10 ед/мл).

Образцы крови были разлиты по 1 мл в 3 различные маркированные пробирки: контрольная проба без антигена и две опытные пробы, в которые вносили по 10 мкл туберкулина PPD (сухой очищенный туберкулин производства С-Петербургского НИИ вакцин и сывороток) и специфический рекомбинантный антиген ESAT-6, полученный одним из авторов в НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалея РАМН. Ампулу сухого очищенного туберкулина разводили 0,6 мл дистиллированной воды, что соответствовало концентрации по белку 1 мг/мл. Антиген ESAT-6, массой 32 кДа, полученный методом генной инженерии, содержал помимо специфического пептида 6 кДа целлюлозу связывающий домен. Конечная концентрация обоих антигенов по белку составляла 10 мкг в мл крови. Образцы крови в стерильных пробирках объемом 5 мл с герметично закрывающимися крышками инкубировали при 37 °С в течение 20–24 ч. На следующий день отбирали по 200 мкл образцов плазмы, в которых определяли концентрацию ИФН γ с помощью разработанной нами иммуноферментной тест-системы.

Для иммуноферментного анализа использовали два моноклональных антитела к различным детерминантам ИФН γ : иммобилизованные в лунках планшета и детектирующие антитела, меченные биотином. ИФН γ , связанный с помощью первых антител, в лунках планшета выявляли с помощью вторых – биотин-меченных антител и ферментного конъюгата – стрептадивин-пероксидазы. Для определения концентрации ИФН γ в образцах плазмы строили калибровочную кривую на основании измерения оптической плотности при 450 нм в лунках стандартного ИФН γ с двукратным разведением от 280 до 8,75 пг/мл. Чувствительность анализа – 10 пкг/мл.

Для статистической обработки полученных результатов использовали программу SAS с помощью параметрических и непараметрических методов анализа. Определяли среднюю величину, стандартное отклонение (дисперсию), медиану и межквартильный (25–75%) уровень результатов. Достоверность различий в изучаемых группах анализировали по критерию Вилкоксона.

Результаты и их обсуждение

Результаты анализа индукции ИФН γ антигенами МБТ – неспецифическим туберкулином PPD и специфическим рекомбинантным антигеном

ESAT-6 при обследовании детей с отрицательной ПМ, поствакциной аллергией и впервые инфицированных («вираж» ПМ) и туберкулез внутригрудных лимфоузлов представлены в таблице.

Индукция ИФН γ туберкулином PPD у детей с конверсией («вираж») туберкулиновой пробы значительно выше ($p < 0,001$), чем у детей с поствакциной БЦЖ-аллергией. Однако в связи с большой вариабельностью получаемых результатов при использовании туберкулина PPD дифференцировать конверсию туберкулиновой пробы, т.е. первичное тубинфицирование, от поствакциной БЦЖ аллергии невозможно.

При использовании специфического рекомбинантного антигена ESAT-6 различия в индукции ИФН γ у пациентов с конверсией ПМ и у детей с поствакциной аллергией не только резко отличаются, но и пригодны для индивидуального дифференцирования. Для индивидуальной оценки наличия туберкулезного инфицирования был принят пороговый критерий уровня индукции ИФН γ более 70 пг/мл. Из 40 детей с клинически установленной поствакциной аллергией все результаты индукции ИФН γ были ниже 70 пг/мл. При «вираже» туберкулиновой пробы из 52 обследованных детей лишь в 3 случаях уровень индукции ИФН γ был ниже порогового критерия. У детей с туберкулезом внутригрудных лимфоузлов, который рассматривается как первичная туберкулезная инфекция, индукция ИФН γ как с туберкулином PPD, так и с использованием специфического ESAT-6 не отличалась от результатов индукции ИФН γ у детей с конверсией ПМ.

При статистическом анализе зависимости между величиной индукции ИФН γ и размером ПМ у 50 впервые инфицированных детей коэффициент корреляции был низким – 0,3.

Однако при сравнении двух групп детей с размером папулы 5–9 мм ($n=15$) и 10–16 мм ($n=35$), различия в уровнях индукции ИФН γ (средние ве-

личины \pm стандартное отклонение) для этих групп при использовании специфического рекомбинантного антигена ESAT-6 были значимыми, составляя 254 ± 228 и 446 ± 314 пг/мл соответственно; $p=0,02$. В то же время различия в этих группах при использовании для индукции ИФН γ туберкулина PPD не были значимыми.

Методы анализа индукции ИФН γ антигенами МБТ, обозначаемые в англоязычной литературе аббревиатурой IGRA (interferon gamma release assay) и наборы реагентов QuantiFERON-TB-Gold [3, 5–8] и T-SPOT.TB [8], в которых используются рекомбинантные антигены ESAT-6 и CFP-10, являются предметом значительного числа исследований, посвященных в основном определению латентной туберкулезной инфекции. В этих исследованиях и при сравнении кожного туберкулинового теста даже при использовании в качестве положительного результата пробы с 10 мм были получены результаты, демонстрирующие намного более высокую специфичность метода индукции ИФН γ с использованием специфических для МБТ антигенов по сравнению с кожным тестом. При проведении исследования индукции ИФН γ рекомбинантными специфическими антигенами у школьников с положительным кожным тестом лишь 9% из них имели положительный результат в тесте с индукцией ИФН γ , но именно в этой группе была отмечена вероятность контактов с больными туберкулезом. Основная часть положительных реакций на туберкулин у школьников, по данным авторов из Норвегии, где заболеваемость туберкулезом низкая, связана с вакцинацией БЦЖ [7].

Большой интерес представляет эта технология для диагностики туберкулеза у детей, в частности, для более точного анализа вспышки туберкулезной инфекции в школьном коллективе [9, 10], а также для диагностики перинатального туберкулеза [11]. Альтернативная тест-система T-SPOT.TB,

Таблица

Индукция ИФН γ антигенами МБТ в образцах крови детей с поствакциной аллергией и детей с первичной туберкулезной инфекцией

Группы обследованных	Диагноз	Кол-во лиц	Концентрация ИФН γ , пг/мл			
			PPD	p (критерий Вилкоксона)	ESAT-6	p (критерий Вилкоксона)
1-я	Туберкулин-отрицательные здоровые	31	85 (48–181)	$p_{1-2} < 0,001$	0 (0–0)	p_{1-2} – н.д.
2-я	Поствакциная БЦЖ-аллергия	40	282 (208–440)	$p_{2-3} < 0,001$	0 (0–0)	$p_{2-3} < 0,001$
3-я	Конверсия ПМ – «вираж»	52	552 (338–862)	$p_{3-6} < 0,001$	351 (152–537)	$p_{3-6} < 0,001$
4-я	Туберкулез внутригрудных лимфоузлов	25	624 (323–1033)	p_{3-4} – н.д.	377 (156–791)	p_{3-4} – н.д.

основанная на измерении количества Т-лимфоцитов, продуцирующих ИФН γ после индукции специфическими антигенами, по данным ряда авторов, является несколько более чувствительной, но менее специфичной [8].

Большинство исследователей отмечает следующие преимущества метода индукции ИФН γ в образцах цельной крови с использованием специфических антигенов по сравнению с традиционным кожным туберкулиновым тестом: 1) метод не связан с введением биологического материала в организм ребенка и не приводит к дополнительной сенсибилизации; 2) новый тест может повторно проводиться в короткие промежутки времени; 3) не требует повторного посещения пациентом медицинского учреждения; 4) является существенно более объективным в методическом отношении.

В разработанной нами тест-системе, в отличие от тест-системы QuantiFERON-TB-Gold, в которой для положительного контроля индукции ИФН γ используют неспецифический стимулятор фитогемагглютинин, в соответствующих тестовых инкубационных пробирках используется туберкулин PPD и специфический рекомбинантный антиген.

Такое решение обусловлено тем, что в связи с всеобщим вакцинированием БЦЖ в нашей стране применение туберкулина может служить в качестве положительного контроля, а также быть дополнительным критерием определения поствакциной БЦЖ-аллергии.

Выводы

1. Метод количественного определения индукции ИФН γ в образцах цельной крови *in vitro* при использовании специфического рекомбинантного антигена ESAT-6 позволяет определить первичное туберкулезное инфицирование у детей и подростков с чувствительностью 94,2% и дифференцировать его от поствакциной БЦЖ-аллергии с высокой специфичностью. Отрицательный уровень индукции ИФН γ с антигеном ESAT-6 при положительной индукции с туберкулином PPD подтверждает поствакцидную БЦЖ-аллергию.

2. Величина индукции ИФН γ в образцах цельной крови с антигеном ESAT-6 у впервые инфицированных детей с размером папулы туберкулиновой пробы 10–16 мм значимо выше, чем у детей с величиной кожной пробы 6–9 мм.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шилова М.В. Туберкулез в России в 2007 г. М.: ООО «ПАГРИ Принт», 2008; 45–46.
2. Овсянкина Е.С., Губкина М.Ф. Проба Манту, ПЦР и ИФА в диагностике туберкулеза у детей и подростков. Биопрепараты. 2004; 1: 8–10.
3. Mazurek, GH, LoBue PA, Daley CL et al. Detection of *Mycobacterium Tuberculosis* Infection by Whole-Blood Interferon-Gamma Release Assay. Clin. Infect. Dis. 2003; 36 (9): 1207–1208.
4. Mazurek, GH, Villarino ME. Guidelines for Using the QuantiFERON-TB Test for Diagnosing Latent *Mycobacterium Tuberculosis* Infection. Centers for Disease Control and Prevention. MMWR Recomm. Rep. 2005; 54: 49–55.
5. Mori T, Sakatani M, Yamagishi F et al. Specific detection of tuberculosis infection; an interferon- γ based assay using new antigens. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2004; 170 (1): 59–64.
6. Eum SY, Lee VJ, Kwak HK et al. Evaluation of the diagnostic utility of a whole-blood interferon-gamma assay for determining the risk of exposure to *Mycobacterium tuberculosis* in

Bacille Calmette-Guerin (BCG)-vaccinated individuals. Tuberculosis. 2008; 88 (1): 31–38.

7. Winje BA, Oftung F, Korsvold GE et al. School based screening for tuberculosis infection in Norway: comparison of positive tuberculin skin test with interferon-gamma release assay. BMC Infect. Dis. 2008; 8: 140–154.

8. Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. Ann. Intern. Med. 2008; 149 (3): 177–184.

9. Molicotti P, Bua A, Mela G et al. Performance of QuantiFERON-TB testing in a tuberculosis outbreak at a primary school. J. Pediatr. 2008; 152 (4): 585–586.

10. Neira-Munoz E, Smith J, Cockcroft P et al. Extensive transmission of *Mycobacterium tuberculosis* among children on a school bus. Pediatr. Infect. Dis. J. 2008; 27 (9): 835–837.

11. Connel T, Bar-Zeev N, Curtis N. Early detection of perinatal tuberculosis using a whole blood interferon-gamma release assay. Clin. Infect. Dis. 2006; 42: 82–85.

