

*Н.В. Корнева, А.А. Старшинова, И.Ф. Довгальук, Ю.Э. Овчинникова, Т.С. Дрозденко,
С.М. Ананьев, О.А. Якунова, Т.В. Тулякова, В.Ю. Журавлев, П.К. Яблонский*

ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОГО ОТВЕТА У ДЕТЕЙ С РАЗЛИЧНЫМИ ПРОЯВЛЕНИЯМИ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» МЗ РФ,
г. Санкт-Петербург, РФ

*Korneva N.V., Starshinova A.A., Dovgaluk I.F., Ovchinnikova I.U.E., Drozdenko T.S.,
Ananiev S.M., Yakunova O.A., Tulyakova T.V., Zhuravlev V.I.U., Yablonsky P.K.*

IMMUNE RESPONSE INDICATORS IN CHILDREN WITH VARIOUS MANIFESTATIONS OF TUBERCULOSIS INFECTION

Saint-Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, Saint-Petersburg, Russia

В статье представлены результаты обследования 155 детей в возрасте от 3 до 14 лет с различными проявлениями туберкулезной инфекции и положительными результатами ДИАСКИНТЕСТ® (ДСТ) и Квантиферон-ТБ Gold (КФ-тест), проведенного на базе отделения детской фтизиатрии ФГБУ «СПбНИИФ» МЗ РФ. Диагностический комплекс включал данные клинических, лучевых (многосрезовая компьютерная томография) и иммунологических методов обследования. На основании результатов обследования сформированы 2 группы: 1-я группа – 126 пациентов с активным туберкулезом органов дыхания, 2-я группа – 29 пациентов с латентной туберкулезной инфекцией (ЛТБИ). По результатам проведенного исследования установлен ряд особенностей иммунологического ответа у детей с ЛТБИ и активным туберкулезом органов дыхания. При ЛТБИ отмечена тенденция к повышению индуцированной продукции цитокинов (IL2, IL4, IFN γ) и отдельных показателей фагоцитарной активности нейтрофилов (ФЧ и ФИ), в то время как при развитии активного специфического процесса выявлена преимущественно активация гуморального ответа (повышение титров противотуберкулезных антител в комплексе серологических реакций и уровня противотуберкулезных антител классов IgA и G по данным anda-tb ELISA). Полученные данные могут служить дополнительным диагностическим критерием при подтверждении состояния ЛТБИ у детей.

Ключевые слова: дети, диагностика, ДИАСКИНТЕСТ®, иммунитет, Квантифероновый тест, туберкулез.

The article represents the results of observation of 155 children aged from 3 to 14 years old with various manifestations of tuberculosis infection and positive results of diagnostic skin tests Diaskintest® (DST) and QuantiFERON®-TB Gold (QFT-G), both conducted on-site at the Pediatric Phthisiology Division of Saint-Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology. The diagnostic complex included the data after clinical, radiological (multi-slice computed tomography, MSCT) and immunological methods of examination, which made it possible to divide patients into two groups: the first group of 126 with active pulmonary tuberculosis, and the second group of 29 with latent tuberculosis infection (LTBI). A number of immunological response features in children with LTBI and active tuberculosis of the respiratory system was determined after the research. In

Контактная информация:

Корнева Наталья Вячеславовна – к.м.н., старший научный сотрудник отделения детской фтизиатрии ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» МЗ РФ
Адрес: Россия, 191036 г. Санкт-Петербург, Лиговский пр-кт, 2–4
Тел.: (812) 297-22-63, E-mail: n.korneva82@mail.ru
Статья поступила 26.06.14, принята к печати 28.01.15.

Contact Information:

Korneva Natalia Vyacheslavovna – Ph.D., Senior Researcher with Pediatric Phthisiology Division of Saint-Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology
Address: Russia, 191036, Saint-Petersburg, Ligovskiy prospect, 2–4
Tel.: (812) 297-22-63, E-mail: n.korneva82@mail.ru
The article received 26.06.14, accepted for publication 28.01.15.

LTBI, there were the tendency to increased induced production of cytokines (IL2, IL4, IFN γ) and separate indicators of phagocytic activity of neutrophils (PAN) revealed, while in the development of active specific process the preferable activation of humoral response (increase in the titers of anti-tuberculosis antibodies in the complex of serologic reactions and in the level of ELISA-based anti-tuberculosis antibodies of IgA and G classes) was identified. The obtained data serve as an additional diagnostic criterion for confirmation of the status of LTBI in children.

Keywords: children, diagnosis, Diaskintest®, QuantiFERON®-TBGold test, immunity, tuberculosis.

Актуальность широкого применения иммунологических тестов в ранней диагностике туберкулеза у детей обоснована минимальными клиническими проявлениями заболевания у данной категории пациентов, олигобациллярностью специфического процесса и сложностью трактовки изменений при проведении стандартного рентгенологического обследования [1–3]. Применяемые во фтизиопедиатрической практике иммунологические методы ДИАСКИНТЕСТ® (ДСТ) и QuantiFERON®-TB (КФ) позволяют выявить пациентов с высоким риском развития туберкулеза, так как их положительные результаты ассоциированы с процессом активного размножения *M. tuberculosis*. ДИАСКИНТЕСТ®, применяемый в Российской Федерации с 2009 г., представляет собой кожный тест с доказанной высокой диагностической чувствительностью и специфичностью, в основе которого – рекомбинантный туберкулезный аллерген, включающий пептиды ESAT-6 (early-secreted antigenic target) и CFP-10 (culture filtrate protein), которые присутствуют у *M. tuberculosis* и отсутствуют у всех штаммов *M. bovis* BCG и большинства нетуберкулезных микобактерий (кроме *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. szulgai*) [4, 5]. QuantiFERON®-TB Gold тест основан на количественном определении интерферона γ (IFN γ) методом иммуноферментного анализа при выявлении *in vitro* клеточного ответа после стимуляции специфичными для *M. tuberculosis* пептидными антигенами ESAT-6, CFP-10 и TB7.7. [5–8].

Обладая высокой диагностической эффективностью в вопросе определения активности туберкулезной инфекции, вышеописанные методы не позволяют разграничить латентную туберкулезную инфекцию (ЛТБИ) и активный туберкулез. Таким образом, окончательный ответ в вопросе дифференциальной диагностики этих состояний дает только мультисрезовая компьютерная томография. Актуальная проблема сегодняшнего дня – поиск дополнительных иммунологических критериев для дифференциальной диагностики ЛТБИ и локальных проявлений туберкулезной инфекции у детей.

Данные об изменении иммунологических показателей у детей с различными проявлениями туберкулезной инфекции в литературе представлены недостаточно, следовательно и требуют дальнейшего изучения.

Цель работы – определение особенностей показателей иммунного ответа у детей с ЛТБИ.

Материалы и методы исследования

Проведено проспективное исследование по типу группа–контроль с обследованием 155 детей с положительной реакцией на пробу Манту 2 ТЕ (более 5 мм согласно инструкции к препарату и Приказу МЗ РФ № 109 от 21.03.2003 «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации») и положительными результатами по иммунологическим тестам (Диаскинтест и Квантифероновый тест) за период с 2011–2013 гг. Возраст детей составил от 3 до 14 лет.

Преобладали пациенты младшего школьного возраста (7–11 лет) – 49,3% (76), пациенты дошкольного возраста (3–6 лет) составили 28,9% (45), старшего школьного возраста (12–14 лет) – 21,8% (34); девочек было 56,1% (87), мальчиков – 43,9% (68).

Диагностический комплекс включал стандартные клинические, бактериологические, а также иммунологические и лучевые методы обследования. Иммунологические методы: определение циркулирующих противотуберкулезных антител (ПТАТ) проводили по реакции пассивного гемолиза (РПГ) и потребления комплемента (РПК) в модификации Б.Е. Кноринг (1975), иммунофлюоресцентного анализа в модификации Р.И. Шендровой, В.Н. Вербовой (1986). Применяли новый серологический метод трехфазного иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью набора anda-tb ELISA для определения антимиkobактериальных антител классов IgA, IgG, IgM в человеческих биологических средах. Оценку субпопуляционного состава лимфоцитов венозной крови проводили с использованием панели моноклональных антител серии ИКО производства НПЦ «Медбиоспектр» (Москва). Подсчитывали относительные показатели содержания субпопуляций лимфоцитов, экспрессирующих отдельные маркеры: CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD20+, CD25+, CD95+, HLA-DR+. Определение уровня индуцированной продукции цитокинов IL2, IL4, ИФН γ , ФНО α проводили в супернатантах методом твердофазного ИФА. Определение функциональной активности нейтрофилов (фагоцитарный индекс – ФИ, фагоцитарное число Райта – ФЧ и индекс завершенности фагоцитоза – ИЗФ) проводили методом фагоцитоза с культурой убитых клеток *Staphylococcus aureus* 209-P. ФИ – % клеток через 30 и 120 мин инкубации, характеризует % фагоцитирующих клеток. ФЧ – среднее количество фагоцитированных микробных частиц, приходящихся на один фагоцит. ИЗФ определяли по формуле: ИЗФ=ФЧ 30 мин/ФЧ 120 мин. При ИЗФ=1 процесс

фагоцитоза считали завершенным. Лучевую диагностику выполняли на многосрезовом спиральном компьютерном томографе «Aquilion-32» (фирма Toshiba) по стандартной методике.

На основании результатов комплексного клиничко-рентгенологического обследования все дети были разделены на 2 группы: 1-я группа (126) – дети с активным туберкулезом органов дыхания (наличие специфических изменений по мультиспиральной компьютерной томографии (МСКТ) на фоне положительных результатов иммунологических тестов (ДСТ и КФ)), 2-я группа (29) – дети с ЛТБИ (отсутствие специфических изменений по МСКТ на фоне положительных результатов по ДСТ и КФ).

Статистическую обработку материала проводили с использованием программ Microsoft Office Word Excel 2010 и GraphPad Prism 6. Применяли непарный критерий Стьюдента (t), критерий хи-квадрат (χ^2). Количественные данные представлены в виде M (SD), где M – выборочное среднее, SD – стандартное отклонение. Для всех видов статистического анализа критический уровень значимости составлял 0,05.

Результаты и их обсуждение

В структуре клинических форм в 1-й группе превалировал туберкулез внутригрудных лимфатических узлов (ТВГЛУ) – у 123 пациентов (97,6%), у 2 (1,6%) – инфильтративный туберкулез легких, у одного (0,8%) – первичный туберкулезный комплекс. Специфический процесс диагностировался в 87,4% (110) в фазе кальцинации, из них у 13 детей (10,5%) были отмечены признаки хронического течения туберкулеза, фаза инфильтрации зарегистрирована только у 16 (12,6%) пациентов. Осложненное течение наблюдалось у 69 (54,3%) пациентов: в виде очагов отсевов в легочную ткань – 51 (40,5%), поражения трахеобронхиального дерева – 20 (15,5%), в единичных случаях выявлены ателектаз сегмента легкого и туберкулез плевры в фазе кальцинации.

В исследовании представлены анализ результатов пробы Манту 2 ТЕ, титров ПТАТ в комплексе серологических реакций, сравнение субпопуляционного состава лимфоцитов, уровня специфических иммуноглобулинов классов А, G и М, цитокинов и фагоцитарной функции нейтрофилов у детей с ЛТБИ и активным туберкулезом органов дыхания.

При сопоставлении результатов пробы Манту

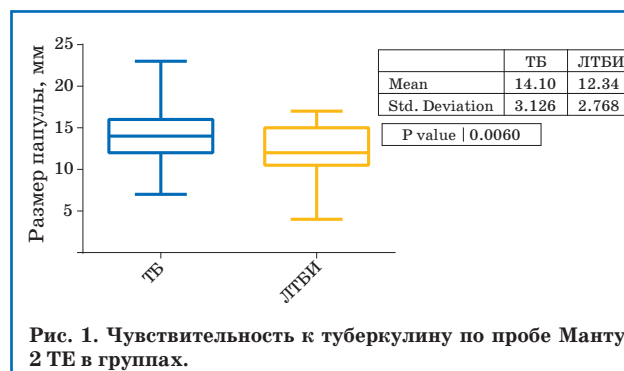


Рис. 1. Чувствительность к туберкулину по пробе Манту 2 ТЕ в группах.

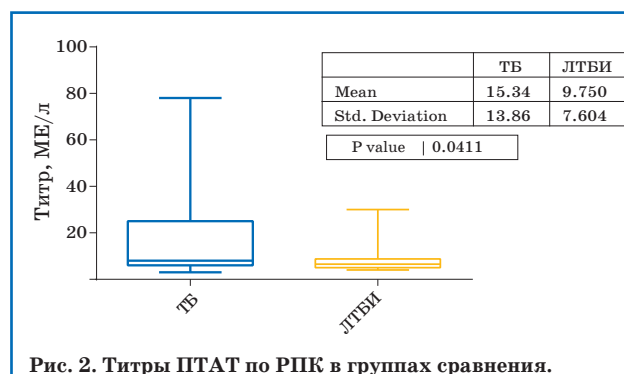


Рис. 2. Титры ПТАТ по РПК в группах сравнения.

2 ТЕ выявлены достоверные различия в уровне чувствительности к туберкулину между группами: в 1-й группе достоверно выше был удельный вес высоких результатов (46% (I) против 27,6% (II), $p < 0,05$), во 2-й группе – преобладали средние результаты (65,5% (II) против 46,8% (I), $p < 0,05$). Результаты пробы Манту 2 ТЕ трактовали в соответствии с приказом № 109 от 21.03.03, где низкий результат регистрируется при размерах папулы от 0 до 9 мм, средний – 11–14 мм, высокий – 15 мм и более.

Средний размер папулы в ответ на пробу Манту 2 ТЕ в 1-й группе ($14,1 \pm 3,1$ мм) достоверно превышал показатель во 2-й группе ($12,3 \pm 2,8$ мм, $p = 0,006$) (рис. 1).

Анализ титров специфических антител показал, что у пациентов 1-й группы по всему спектру сероиммунологических реакций диагностические титры были выше, чем во 2-й группе. Статистически значимые различия установлены только по результатам РПК ($15,34 \pm 13,86$ в 1-й группе против $9,75 \pm 7,6$ во 2-й группе, $p = 0,04$): титры ПТАТ в 1-й группе были достоверно выше в сравнении со 2-й (рис. 2).

Выявлены статистически значимые различия титров антимикобактериальных антител

Таблица 1

Уровень антимикобактериальных антител IgA, IgG, IgM классов в крови по данным anda-tb ELISA в группах сравнения (n=155)

Группы	IgA, ед/мл		IgG, ед/мл		IgM, ед/мл	
	M±SD	диагностический титр абс. (%)	M±SD	диагностический титр абс. (%)	M±SD	диагностический титр абс. (%)
1-я группа (n=126)	53,2±43,9	2 (1,6%)	80,4±78,3	15 (11,7%)	0,84±0,29	20 (15,9%)
2-я группа (n=29)	49,4±36,4	–	58,8±17,7	–	1,06±0,35	9 (31%)
p	–	–	<0,01	–	<0,05	–

Субпопуляционный состав лимфоцитов в периферической крови у пациентов исследуемых групп (n=109)

Показатели	1-я группа (n=94)			2-я группа (n=15)			P
	М	SD	95%-ДИ	М	SD	95%-ДИ	
CD3+, %	59,3*	11,8	56,9–61,7	49,6	8,8	44,8–54,5	0,003
CD4+, %	35,9*	7	34,5–37,3	31,7	5,3	28,7–34,6	0,02
CD25+, %	12,7	6	11,4–13,9	17,1*	6,4	13,6–20,7	0,009
HLA II+, %	19,5	11,7	17,1–21,9	24,2*	5,2	21,3–27,1	0,01
CD95+, %	22*	10,1	20–24,1	19,1	4,5	16,6–21,6	0,01

IgG и IgM классов в крови при применении набора anda-tb ELISA. В 1-й группе достоверно выше был уровень IgG, в то время как во 2-й группе определялся высокий уровень IgM (табл. 1).

Как видно из табл. 1, достоверных различий уровня IgA не выявлено, однако отмечена тенденция повышения уровня IgA у пациентов с активным туберкулезом, что указывает на усиление гуморального ответа в ответ на длительную антигенную стимуляцию.

Субпопуляционный состав лимфоцитов в периферической крови изучили у 109 пациентов (табл. 2).

Как видно из табл. 2, для пациентов 1-й группы были характерны достоверно высокие величины относительного содержания CD3+, CD4+ и CD95+, в то время как во 2-й группе отмечено достоверное повышение CD25+ и HLA II+.

Уровень продукции индуцированных цитокинов изучили у 60 детей. Статистически значимые различия отсутствовали, вместе с тем отмечена тенденция повышения уровня всех исследуемых цитокинов у пациентов с ЛТБИ (2-я группа): IL2 (323±244,9 против 274,5±203,6 пг/мл); IL4 (2,30±1,05 против 1,65±1,02 пг/мл); IFN γ (22856±10800 против 20800±11055 пг/мл); TNF α (1111±681,5 против 954,9±732,1 пг/мл).

Показатели фагоцитарной активности нейтрофилов у пациентов обеих групп были сопоставимы с некоторым повышением фагоцитарного числа (71,1±3,05 против 66,88±3,36) и фагоцитарного индекса (7,34±1,23 против 4,85±0,49) во 2-й группе. Индекс завершенности фагоцитоза в группах не различался (0,92±0,14 (I) против 0,94±0,06 (II) и был ниже единицы, что свидетельствует об ограничении фагоцитарных возможностей при активном размножении *M. tuberculosis* в организме.

Литература

1. Довгалиук И.Ф., Старшинова А.А., Овчинникова Ю.Э., Корнева Н.В., Якунова О.А. Новый подход к диагностике туберкулеза органов дыхания у детей. Медицинский альманх. 2013; 2: 43–49.
2. Яблонский П.К., Довгалиук И.Ф., Старшинова А.А., Якунова О.А. Значение современных иммунологических тестов в диагностике туберкулеза у детей. Медицинская иммунология. 2013; 15 (1): 37–44.
3. Слогоцкая Л.В. Туберкулинодиагностика и новые тесты для выявления инфекции. Медицинский вестник. 2013; 17–18 (630–631): 16–17.
4. Аксенова В.А., Севастьянова Т.А., Клевно Н.И., Ланшина В.Н. Туберкулез у детей и подростков в России (проблемы и пути решения в XXI веке). Вопросы современной педиатрии. 2011; 10 (3): 7–11.

Выводы

1. Проведенное исследование выявило ряд особенностей иммунного ответа у детей с ЛТБИ в отличие от активного туберкулеза, которые могут служить дополнительными диагностическими критериями при дифференциальной диагностике этих состояний у детей.

2. В 1-й группе (активный туберкулез) достоверно преобладал удельный вес высоких результатов пробы Манту 2 ТЕ. Титры ПТАТ были выше в сравнении со 2-й группой по всему спектру серологических реакций, достоверные различия отмечены только по результатам РПК. При определении антимикобактериальных антител (anda-tb ELISA) выявлено достоверное повышение уровня Ig G и тенденция повышения уровня IgA. Клеточный иммунитет характеризовался повышением CD3+, CD4+ и CD95+, уровень индуцированных цитокинов был ниже, чем во 2-й группе. Отмечено угнетение фагоцитарной активности нейтрофилов, показатели фагоцитоза в обеих группах были сопоставимы как на этапе ЛТБИ, так и при развитии активного туберкулеза.

3. Для 2-й группы (ЛТБИ) были характерны следующие особенности: средний размер инфильтрата по пробе Манту 2 ТЕ был достоверно менее выражен в сравнении с 1-й группой. При этом средние результаты встречались достоверно чаще (46,8% (I) против 65,5% (II)). При ЛТБИ отмечена тенденция повышения индуцированной продукции цитокинов и отдельных показателей фагоцитарной активности нейтрофилов (ФЧ и ФИ), повышение уровня антител класса IgM по данным anda-tb ELISA; определение субпопуляционного состава лимфоцитов выявило достоверное повышение относительного числа CD25+ и HLA II+.

5. Starshinova A, Dovgaliuk I, Yakunova O. Immunological parameters in patterns with tuberculosis. 46th Nordic Lung Congress, Reykjavik, Iceland. 2013: 63.
6. Mazurek GH, Jereb J, Lobue P, Iademarco MF, Metchock B, Vernon A. Guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold test for detecting *Mycobacterium tuberculosis* infection. MMWR Recomm. Rep. 2005; 54: 49–55.
7. Vordermeier MH, Chambers MA, Cockle PJ, Whelan AO, Simmons J, Hewinson RG. Correlation of ESAT-6-specific gamma interferon production with pathology in cattle following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination against experimental. J. Infect. Immun. 2002; 70: 3026–3032.
8. Weldingh K, Andersen P. ESAT-6/CFP-10 skin test predicts disease in *M. tuberculosis*-infected guinea pigs. PLoS ONE. 2008; 3 (4): 1978.