

УДК 616-002.5-053.3.3/4-079.4

DOI: 10.34215/1609-1175-2022-4-54-57



TREC – персонализированный предиктор риска туберкулеза у детей раннего и дошкольного возраста

С.В. Смердин¹, М.А. Плеханова¹, О.А. Калинина², Р.И. Луданный¹, С.В. Лазебный¹,
П.Н. Филиппов¹, А.В. Казаков³, Д.А. Кудлай^{4,5}, А.Д. Пахлавонova³

¹ Московский областной клинический противотуберкулезный диспансер, Москва, Россия

² Малаховский детский туберкулезный санаторий, Москва, Россия

³ Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний, Москва, Россия

⁴ Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Россия

⁵ ГИЦ «Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия

Цель: выполнить количественную оценку показателей TREC и KREC у детей раннего и дошкольного возраста с туберкулезной инфекцией (ТИ). **Материал и методы.** Проведено проспективное, поперечное исследование в 2022 г. Группу наблюдения составили 87 детей раннего и дошкольного возраста из контакта с больными туберкулезом (ТБ): 27 – с установленным диагнозом ТБ, 34 – дети с наличием ТИ по результатам туберкулинодиагностики без признаков локального специфического процесса, 26 – дети без признаков ТИ по результатам кожных проб и локального процесса (условно здоровые дети). **Результаты.** Определены факторы, значимые при оценке ТИ: противотуберкулезная терапия ($F = 42,001$; $p = 0,000001$), положительная или отрицательная реакция на аллерген туберкулезный рекомбинантный при проведении внутрикожного теста ($F = 39,394$; $p = 0,000001$), высокий уровень TREC в крови ($F = 12,707$; $p = 0,000001$), наличие реакции на туберкулин ($F = 10,625$; $p = 0,000006$) и уровень KREC ($F = 3,182$; $p = 0,039$). **Заключение.** Полученные результаты позволяют рассматривать количество TREC в качестве персонализированного предиктора риска прогрессирования ТИ у детей раннего и дошкольного возраста.

Ключевые слова: дети, туберкулезная инфекция, специфический иммунный ответ, противотуберкулезная терапия, кольцевые ДНК, TREC, KREC, иммунодиагностика

Поступила в редакцию 07.10.22. Получена после доработки 24.10.22. Принята к печати 22.11.22

Для цитирования: Смердин С.В., Плеханова М.А., Калинина О.А., Луданный Р.И., Лазебный С.В., Филиппов П.Н., Казаков А.В., Кудлай Д.А., Пахлавонova А.Д. TREC – персонализированный предиктор риска туберкулеза у детей раннего и дошкольного возраста. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2022;4:54–57. doi: 10.34215/1609-1175-2022-4-54-57

Для корреспонденции: Плеханова Мария Александровна – доктор медицинских наук, доцент, заместитель главного врача по научно-клинической работе Московского областного клинического противотуберкулезного диспансера (127055, г. Москва, пл. Борьбы, 11, стр. 1); ORCID: 0000-0003-1687-7598; тел.: +7 (913) 664-66-20; e-mail: plekhanovama@mokptd.ru

TREC as a personalized tuberculosis predictor in infants and preschool children

S.V. Smerdin¹, M.A. Plekhanova¹, O.A. Kalinina², R.I. Ludanny¹, S.V. Lazebny¹, P.N. Filippov¹,
A.V. Kazakov³, D.A. Kudlay^{4,5}, A.D. Pahlavonova³

¹ Moscow regional clinical tuberculosis dispensary, Moscow, Russia; ² Malakhovsky children's tuberculosis sanatorium, Moscow, Russia; ³ National medical research center for phthisiopulmonology and infectious diseases, Moscow, Russia; ⁴ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia; ⁵ National Research Center – Institute of Immunology of Federal Medical-Biological Agency (Institute of Immunology of FMBA), Moscow, Russia

Aim. Quantitative assessment of TREC and KREC in infants and preschool children infected with tuberculosis infection (TI). **Material and methods.** A prospective cross-sectional study was conducted in 2022. The observation group consisted of 87 children of early childhood age in contact with TB patients, of whom 27 were diagnosed with TB, 34 were tested positive to TB based on skin tests without signs of a local specific process (TI), 26 were children without signs of tuberculosis infection according to the results of skin tests and local process (conditionally healthy children). **Results.** The following factors significant in the assessment of tuberculosis infection were determined: anti-tuberculosis therapy ($F = 42.001$; $p = 0.000001$); positive or negative response to the tuberculosis recombinant allergen (RTA) during an intradermal test ($F = 39.394$; $p = 0.000001$); high TREC levels in the blood ($F = 12.707$; $p = 0.000001$); the presence of a tuberculin response ($F = 10.625$; $p = 0.000006$); and KREC levels ($F = 3.182$; $p = 0.039$). **Conclusions.** According to the obtained results, TREC levels can be considered as a personalized risk predictor of tuberculosis infection in infants and preschool children.

Keywords: children, tuberculosis infection, specific immune response, anti-tuberculosis therapy, DNA circle, TREC, KREC, immunodiagnostics

Received 7 October 2022. Revised 24 October 2022. Accepted 22 November 2022

For citation: Smerdin S.V., Plekhanova M.A., Kalinina O.A., Ludanny R.I., Lazebny S.V., Filippov P.N., Kazakov A.V., Kudlay D.A., Pahlavonova A.D. TREC as a personalized tuberculosis predictor in infants and preschool children. *Pacific Medical Journal*. 2022;4:54–57. doi: 10.34215/1609-1175-2022-4-54-57

Corresponding author: Maria A. Plekhanova, MD, Associate Professor, Deputy chief physician for scientific and clinical work of the Moscow regional clinical tuberculosis dispensary (11, p. 1, Borby square, Moscow, 127055, Russian Federation); ORCID: 0000-0003-1687-7598; phone: +7 (913) 664-66-20; e-mail: plekhanovama@mokptd.ru

В защите от туберкулеза (ТБ) важную роль играют генетические факторы, регулирующие иммунные механизмы [1, 2]. При этом распознавание прогрессирования туберкулезной инфекции (ТИ), а также разделение латентного и активного ТБ по спектру клинических проявлений не представляется возможным даже с учетом известных факторов риска, но такую возможность могли бы предоставить разработанные диагностические тесты для оценки напряженности специфического иммунитета [3]. Риск ТБ в первую очередь необходимо рассматривать среди людей с латентной туберкулезной инфекцией (ЛТИ), но при этом подтвержденные оценки персонализированного риска практически отсутствуют [4, 5].

Оптимизация борьбы с ТИ требует внедрения новых диагностических инструментов. Таким подходом может стать метод количественной оценки кольцевых участков ДНК, побочных продуктов реаранжировки генов антиген-распознающих рецепторов Т-клеток – TREC (T-cell receptor excision circle) и В-клеток – KREC (kappa-deleting recombination excision circle), отражающий функциональное состояние клеточного иммунитета в реальном времени. В настоящее время интерес к мультиплексному анализу TREC и KREC направлен в первую очередь на диагностику инфекционного процесса, мониторинг первичных иммунодефицитных состояний и других расстройств иммунной системы [6, 7, 8].

Цель исследования состояла в количественной оценке TREC и KREC у детей раннего и дошкольного возраста с ТИ.

Материал и методы

Дизайн исследования – проспективное, поперечное. Работа выполнена в 2022 г. на базе ГБУЗ МО «Московский областной клинический противотуберкулезный диспансер», ГКУЗ МО «Малаховский детский туберкулезный санаторий», ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний», Москва. Молекулярно-генетические исследования проведены на базе бактериологической лаборатории ГБУЗ МО «Московский областной клинический противотуберкулезный диспансер». На проведение исследований получено разрешение локального этического комитета ГБУЗ МО «Московский областной клинический противотуберкулезный диспансер» (протокол № 4 от 15.12.2021 г.). Для участия детей в исследовании от родителей или их законных представителей было получено добровольное информированное согласие.

В исследование включено 87 детей из контакта с больными ТБ, которые разделены на три группы: 1-я группа ($n = 27$) – дети с установленным диагнозом ТБ, 2-я группа ($n = 34$) – дети с наличием ТИ

по результатам туберкулинодиагностики без признаков локального специфического процесса; 3-я группа ($n = 26$) – дети без признаков ТИ по результатам кожных проб и локального процесса (условно здоровые дети). Средний возраст детей составил $5,6 \pm 0,205$ года.

Всем пациентам проводилась комплексная оценка состояния здоровья. Обследование включало стандартные общеклинические, клинико-рентгенологические и лабораторные исследования согласно Приказу МЗ РФ № 109 от 21.03.2003 г. и клиническим рекомендациям по ЛТИ [9]. Кожные пробы (проба Манту с 2 ТЕ (ППД-Л), проба с аллергеном туберкулезным рекомбинантным (Диаскинтест® АТР, CFP10-ESAT6 0,2 мкг) проводили на момент включения в исследование. Согласно определению ВОЗ 2022 года, ТИ представляет состояние стойкого иммунного ответа на стимуляцию антигенами микобактерий туберкулеза без признаков клинических проявлений ТБ. Проба с АТР по данным многих авторов позволяет дифференцировать поствакцинальную и инфекционную аллергию у детей аналогично лабораторным иммунологическим тестам, рекомендованным для выявления ТИ в мире [10, 11].

Среди всех обследованных детей 10 пациентов (11,5%) получали противотуберкулезную терапию, из них 8 человек входили в группу 1; два ребенка – в группу 2 (были исключены из последующего анализа). Все дети групп 2 и 3 находились в специализированном санатории по контакту с больными ТБ. В период забора крови ни один пациент, включенный в исследование, не имел проявлений острой респираторной инфекции или обострения аллергического заболевания.

Всем детям провели молекулярно-генетическое исследование: выделение ДНК и количественное определение TREC и KREC. Выделение ДНК выполняли из сухого пятна крови (кровь собирали на ДНК-карты, «Алкор Био» РУ РФ № РЗН 2016/4615) согласно инструкции набора для выделения ДНК из сухих пятен «Экстра-ДНК-Био», а определение TREC и KREC – согласно инструкции набора реагентов для диагностики *in vitro* «Иммуно-БиТ» для количественного определения ДНК TREC и KREC методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени по ТУ 21.20.23-002-17608775-2021.

Для проведения статистической обработки фактического материала применялись методы статистического анализа с использованием пакета программ BioStat LE 7.6.5.0, NCSS 2022, v22.0.4. Определяли $M \pm SEM$; доверительный интервал с уровнем $p = 0,95$ (95% CI) и медиану (ME); квартиль верхний и нижний $p = 0,25$ и $p = 0,75$ (Q 25% : Q 75%). Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента (t). Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p \leq 0,05$. Для оценки значимости признаков применяли дисперсионный анализ.

Результаты исследования

При распределении полученных значений копий TREC и KREC на 10^5 клеток в сухих пятнах крови мы учитывали показатели квартилей [12]: верхнего и нижнего ($Q\ 25\% : Q\ 75\%$). У детей раннего и дошкольного возраста в группе условно здоровых (3-я группа) для TREC нижняя граница соответствовала 175, верхняя – 760. Для KREC: нижняя граница – на уровне 540, верхняя – 2170.

Во второй группе детей с ТИ, не получающих противотуберкулезную терапию ($n = 32$), установили TREC/ 10^5 PBMC на среднем уровне $576,6 \pm 65,7$ и KREC/ 10^5 PBMC – $1590,5 \pm 245,3$. Сравнивая результаты TREC/ 10^5 PBMC с показателями детей группы 3, значимых различий не было установлено ($t = 2,005$; $p = 0,205$), так же как и по показателям KREC/ 10^5 PBMC ($t = 2,005$; $p = 0,938$).

При анализе результатов «Иммуно-БиТ» у детей первой группы с ТБ установлено, что до начала противотуберкулезной терапии ($n = 19$) средний уровень TREC/ 10^5 PBMC составил $1142,8 \pm 166,6$, а KREC/ 10^5 PBMC – $2156,6 \pm 385,2$. Сравнивая результаты TREC/ 10^5 PBMC больных туберкулезом с показателями детей без ТИ, установили значимые различия ($t = 2,02$; $p = 0,00008$).

Среди детей группы 2, не получающих противотуберкулезную терапию, по результатам количественного определения ДНК TREC/ 10^5 PBMC с учетом верхней границы показателя в 9 случаях (28,1%) установили уровень выше верхней границы референсных значений, средний уровень составил $992,1 \pm 99,4$, что статистически значимо выше, чем в группе 3 ($t = 2,035$; $p = 0,00002$), при этом различий с показателями больных ТБ не было установлено ($t = 2,056$; $p = 0,531$). Средний уровень KREC/ 10^5 PBMC $1647,9 \pm 380,7$ был в пределах референсных значений.

В остальных случаях ($n = 23$) у детей с ТИ средний уровень TREC/ 10^5 PBMC составил $384,3 \pm 38,4$, а KREC/ 10^5 PBMC – $1455,0 \pm 316,1$, при этом показатели были в пределах установленных референсных значений. Сравнивая эти результаты с результатами больных ТБ, установили значимые различия ($t = 2,05$; $p = 0,00003$), но, сравнивая с показателями детей без ТИ, различий не было установлено ($t = 2,02$; $p = 0,285$).

Были выделены основные признаки, связанные с туберкулезной инфекцией: наличие или отсутствие противотуберкулезной терапии, результаты пробы с АТР, с ППД-Л и количество TREC и KREC.

Дисперсионный анализ показал, что все признаки вносили значимый вклад в оценку ТИ, которые распределились по уровню значимости: противотуберкулезная терапия ($F = 42,001$; $p = 0,000001$), реакция на АТР ($F = 39,394$; $p = 0,000001$), уровень TREC ($F = 12,707$; $p = 0,000001$), реакция на ППД-Л ($F = 10,625$; $p = 0,000006$), менее значимым признаком был уровень KREC ($F = 3,182$; $p = 0,039$).

Обсуждение полученных данных

Отсутствие эффективных инструментов, в том числе «золотого стандарта», для диагностики и прогнозирования перехода ТИ в активное состояние [13] свидетельствует о необходимости поиска дополнительных методов. Оценка состояния клеточного иммунитета позволяет предположить течение ТБ у детей [14], для оценки функционального состояния клеточного иммунитета в реальном времени мы обратили внимание на количественный анализ кольцевых фрагментов ДНК TREC и KREC [6].

Необходимо подчеркнуть, что до настоящего времени исследований, направленных на оценку уровня эксцизионных колец ДНК TREC и KREC у детей раннего и дошкольного возраста при наличии ТИ не проводилось. Оценивая уровень TREC и KREC у детей раннего и дошкольного возраста при наличии ТИ, мы учитывали результаты специфических иммунологических тестов – внутрикожных тестов с туберкулином и Диаскинтестом. Определив верхние границы уровня TREC у детей с ТИ, мы дополнительно установили в каждом третьем случае (28,1%) активацию Т-клеточного иммунного ответа. Учитывая, что высокий уровень TREC среди детей с наличием ТИ, не получающих противотуберкулезную терапию, соответствовал уровню при развитии ТБ. При этом у каждого пятого ребенка (22,2%) высокий уровень TREC совпал с положительной реакцией на пробу с АТР, подтверждая высокий риск развития ТБ.

Определение показателей TREC и KREC отражает текущее состояние иммунной системы. Согласно нашим данным, определение высокого уровня TREC у детей раннего и дошкольного возраста с ТИ свидетельствует об активности инфекции и может рассматриваться в качестве персонализированного маркера (предиктора) для оценки риска прогрессирования ТИ.

Таким образом, определение уровня TREC у детей позволяет дифференцированно подойти к определению риска прогрессирования ТБ.

Заключение

При диагностике TREC и KREC у детей раннего и дошкольного возраста с ТИ было установлено, что часть пациентов имеет высокий уровень TREC, соответствующий уровню напряженности клеточного иммунитета при ТБ. Эти данные позволяют рассматривать показатель TREC в качестве персонализированного предиктора риска прогрессирования ТИ.

Конфликт интересов: авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования: авторы заявляют о финансировании проведенного исследования из собственных средств.

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования – ССВ, КДА, ПМА

Сбор и обработка материала – КОА, ЛРИ, ЛСВ, ФПН, КАВ, ПАД

Статистическая обработка данных – ПМА, ЛРИ

Написание текста – ПМА

Редактирование – ССВ, КДА

Литература / References

1. Delbridge LM, O’Riordan MX. Innate recognition of intracellular bacteria. *Curr. Opin. Immunol.* 2007;19(1):10–6. doi: 10.1016/j.coi.2006.11.005
2. van den Berg TK, Yoder JA, Litman GW. On the origins of adaptive immunity: innate immune receptors join the tale. *Trends Immunol.* 2004;25(1):11–6. doi: 10.1016/j.it.2003.11.006
3. Drain PK, Bajema KL, Dowdy D, Dheda K, Naidoo K, Schumacher SG, Ma S, Meermeier E, Lewinsohn DM, Sherman DR. Incipient and Subclinical Tuberculosis: a Clinical Review of Early Stages and Progression of Infection. *Clin Microbiol Rev.* 2018;31(4):e00021-18. doi: 10.1128/CMR.00021-18
4. Gupta RK, Calderwood CJ, Yavilinsky A, Krutikov M, Quartagno M, Aichelburg MC, Altet N, Diel R, Dobler CC, Dominguez J, Doyle JS, Erkens C, Geis S, Halder P, Hauri AM, Hermansen T, Johnston JC, Lange C, Lange B, van Leth F, Muñoz L, Roder C, Romanowski K, Roth D, Sester M, Sloot R, Sotgiu G, Woltmann G, Yoshiyama T, Zellweger JP, Zenner D, Aldridge RW, Copas A, Rangaka MX, Lipman M, Noursadeghi M, Abubakar I. Discovery and validation of a personalized risk predictor for incident tuberculosis in low transmission settings. *Nat Med.* 2020;26(12):1941–9. doi: 10.1038/s41591-020-1076-0
5. Плеханова М.А., Ткачук А.П., Пацула Ю.И., Смердин С.В. Полиморфный вариант гена IFNG и уровень антиген-специфической продукции интерферона-γ у детей. *Тихоокеанский медицинский журнал.* 2021;(1):28–33. [Plekhanova MA, Tkachuk AP, Patsula UI, Smerdin SV. Polymorphic variant of the IFNG-gene and the level of antigen-specific production of interferon-γ in children. *Pacific Medical Journal.* 2021;1:28–33 (In Russ.)]. doi: 10.34215/1609-1175-2021-1-28-33
6. Хачирова Л.С., Барычева Л.Ю., Кубанова Л.Т., Гордукова М.А., Голубева М.В., Караулов А.В. Диагностическая значимость эксцизионных колец реаранжировки генов Т- и В-клеточных рецепторов для диагностики иммунных нарушений у новорожденных. *Медицинский вестник Северного Кавказа.* 2019;14(4):631–5. [Khachirova LS, Barycheva LY, Kubanova LT, Gordukova MA, Golubeva MV, Karaulov AV. Diagnostic significance of excision rings of T- and B-cell receptor gene rearrangement for the diagnosis of immune disorders in newborns. *Medical News of the North Caucasus.* 2019;14(4):631–5 (In Russ.)]. doi: 10.14300/mnnc.2019.14157
7. Козлов В.А., Тихонова Е.П., Савченко А.А., Кудрявцев И.В., Андронova Н.В., Анисимова Е.Н., Головкин А.С., Демин Д.В., Здзитовецкий Д.Э., Калинина Ю.С., Каспаров Э.В., Козлов И.Г., Корсунский И.А., Кудлай Д.А., Кузьмина Т.Ю., Миноранская Н.С., Продеус А.П., Старикова Э.А., Черданцев Д.В., Чесноков А.Б., Шестерня П.А., Борисов А.Г. *Клиническая иммунология. Практическое пособие для инфекционистов.* Красноярск: Поликор, 2021. – 563 с. [Kozlov VA, Tikhonova EP, Savchenko AA, Kudryavtsev IV, Andronova NV, Anisimova EN, Golovkin AS, Demina DV, Zdzitovetsky DE, Kalinina YuS, Kasparov EV, Kozlov IG, Korsunsky IA, Kudlay DA, Kuzmina TYu, Minoranskaya NS, Prodeus AP, Starikova EA, Cherdantsev DV, Chesnokov AB, Gear PA, Borisov AG. *Clinical immunology. A practical guide for infectious disease specialists.* Krasnoyarsk: Polikor, 2021. 563 p. (In Russ.)].
8. Savchenko AA, Tikhonova E, Kudryavtsev I, Kudlay D, Korsunsky I, Beleniuk V, Borisov A. TREC/KREC Levels and T and B Lymphocyte Subpopulations in COVID-19 Patients at Different Stages of the Disease. *Viruses.* 2022;14(3):646. doi: 10.3390/v14030646.
9. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению латентной туберкулезной инфекции у детей. – Москва: РООИ «Здоровье человека»; 2015. [Federal clinical guidelines for the diagnosis and treatment of latent tuberculosis infection in children. – Moskva: Zdorov’e cheloveka; 2015. (In Russ.)].
10. Аксёнова В.А., Леви Д.Т., Александрова Н.В., Кудлай Д.А., Барышникова Л.А., Клевно Н.И. Туберкулез у детей: современные методы профилактики и ранней диагностики. *Доктор.Ру.* 2017;15(144):9–15 [Aksyonova VA, Levi DT, Alexandrova NV, Kudlay DA, Baryshnikova LA, Klevno NI. Tuberculosis in children: modern methods of prevention and early diagnosis. *Doctor.Ru.* 2017;15(144):9–15 (In Russ.)].
11. WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 3: diagnosis. Tests for tuberculosis infection. Geneva: World Health Organization; 2022 URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240056084> (Accessed 23.10.2022).
12. Образцов И.В., Фёдорова Л.А., Продеус А.П., Кудлай Д.А., Корсунский И.А. Референсные значения концентрации TREC и KREC у детей и подростков в возрасте 1–17 лет. *Педиатрия им. Г.Н. Сперанского.* 2021;100 (6):38–45. [Obraztsov IV, Fedorova LA, Prodeus AP, Kudlay DA, Korsunsky IA. Reference values for the concentration of TREC and KREC in children aged 1–17 years. *Pediatrics named after G.N. Speransky.* 2021;100(6):38–45. (In Russ.)].
13. Cliff JM, Kaufmann SH, McShane H, van Helden P, O’Garra A. The human immune response to tuberculosis and its treatment: a view from the blood. *Immunol Rev.* 2015;264(1):88–102. doi: 10.1111/imr.12269
14. Plekhanova MA. Adaptive immunity and genetic aspects of tuberculosis in children. *Bulletin of RSMU.* 2017;5:34–40. doi: 10.24075/brsmu.2017-05-03