

УДК 616-002.5-053.2-078:578.245

DOI: 10.34215/1609-1175-2021-2-61-64

Технологический замысел гамма-интерференовых тестов *in vitro* по выявлению эффекторных Т-клеток, реагирующих на стимуляцию антигеном *Mycobacterium tuberculosis*, у детей

Л.А. Барышникова¹, Р.Х. Фатыхова², Д.А. Кудлай^{3,4}, А.П. Алексеев², М.Н. Кабаева¹

¹ Самарский областной клинический противотуберкулезный диспансер им. Н.В. Постникова, Самара, Россия;

² Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер, Казань, Россия; ³ Первый Московский государственный университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия; ⁴ ГНЦ «Институт иммунологии», Москва, Россия

Цель: определить место теста высвобождения гамма-интерферона T-Spot.TB в алгоритме обнаружения и диагностики различных проявлений туберкулезной инфекции у детей и подростков. **Материал и методы.** Изучены результаты теста T-Spot.TB у детей в возрасте до 17 лет, как альтернативного метода скрининга (n=4096), в VI группе диспансерного наблюдения (n=645) и у больных туберкулезом (n=15). **Результаты.** Эффективность T-Spot.TB в качестве скринингового теста составила 2,8%. Сопоставление результатов этого тестирования и кожной пробы с аллергеном туберкулезным рекомбинантным (АТР) через год наблюдения показало наличие отрицательного результата в 90,7% случаев при наличии сомнительных и слабоположительных реакций на АТР. **Заключение.** Скрининг детского населения на туберкулезную инфекцию в возрасте до 7 лет включительно следует проводить при помощи пробы Манту, от 8 до 17 лет включительно – при помощи пробы с АТР. В качестве альтернативного метода скринингового обследования детей, чьи законные представители отказались от рекомендованных кожных проб, может быть проведен на коммерческой основе гамма-интерфероновый тест T-Spot.TB. К медицинским показаниям для назначения этого теста детям и подросткам следует отнести иммуносупрессию различного генеза, аллергические заболевания и ожирение.

Ключевые слова: туберкулезная инфекция, дети и подростки, Татарстан, Самарская область, тест T-Spot.TB

Поступила в редакцию 21.03.2021. Получена после доработки 12.04.2021. Принята к печати 27.05.2021

Для цитирования: Барышникова Л.А., Фатыхова Р.Х., Кудлай Д.А., Алексеев А.П., Кабаева М.Н. Технологический замысел гамма-интерференовых тестов *in vitro* по выявлению эффекторных Т-клеток, реагирующих на стимуляцию антигеном *Mycobacterium tuberculosis*, у детей. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2021;2:61–4. doi: 10.34215/1609-1175-2021-2-61-64

Для корреспонденции: Барышникова Лада Анатольевна – д-р мед. наук, Самарский областной клинический противотуберкулезный диспансер им. Н.В. Постникова (443068, г. Самара, ул. Ново-Садовая, 154); ORCID: 0000-0001-7788-4869; e-mail: barishnikovalada@yandex.ru

The technological concept of *in vitro* gamma-interferon tests to identify effector T cells that respond to stimulation with the *Mycobacterium tuberculosis* antigen and their use among children

L.A. Baryshnikova,¹ R.H. Fatykhova,² D.A. Kudlay,^{3,4} A.P. Alekseev,² M.N. Kabaeva¹

¹ N.V. Postnikov Samara Regional Clinical Tuberculosis Dispensary, Samara, Russia; ² Republican Clinical Tuberculosis

Dispensary, Kazan, Russia; ³ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia; ⁴ NRC Institute of Immunology, Moscow, Russia

Objective: To define the test place of T-Spot.TB gamma-interferon release in the algorithm of diagnosing and diagnostics of different onsets of tuberculosis infection among children and adolescents. **Methods:** T-Spot.TB test results among children under 17 years old were examined as an alternative screening method (n=4096), in VI dispensary observation group (n=645) and among patients suffering tuberculosis (n=15). **Results:** T-Spot.TB effectiveness as a screening test was 2.8%. Matching this test's results and the skin test with tuberculosis recombinant allergen (TRA) in a year of observation demonstrated negative result in 90.7% of cases in the event of uncertain or weakly positive TRA reaction. **Conclusions:** Child population tuberculosis screening under 7 years old should be held using Mantoux reaction, but from 8 to 17 years old – using TRA test. Gamma-interferon T-Spot.TB test can be held on a contract basis as an alternative child screening method if the legal representative refused to make recommended skin tests. Immunosuppression of various origins, allergies and obesity can be considered as medical indicators to prescribe this test for children and adolescents.

Keywords: tuberculosis infection, children and adolescents, Tatarstan, Samara region, T-Spot.TB test

Received 21 March 2021; Revised 12 April 2021; Accepted 27 May 2021

For citation: Baryshnikova LA, Fatykhova RH, Kudlay DA, Alekseev AP, Kabaeva MN. The technological concept of *in vitro* gamma-interferon tests to identify effector T cells that respond to stimulation with the *Mycobacterium tuberculosis* antigen and their use among children. *Pacific Medical Journal*. 2021;2:61–4. doi: 10.34215/1609-1175-2021-2-61-64

Corresponding author: Lada A. Baryshnikova, MD, PhD, N.V. Postnikov Samara Regional Clinical Tuberculosis Dispensary (154 Novo-Sadovaya St., Samara, 443068, Russian Federation); ORCID: 0000-0001-7788-4869; e-mail: barishnikovalada@yandex.ru

Законом РФ к приоритетным направлениям здравоохранения отнесены охрана здоровья детей и профилактика [1]. Механизм реализации данных направлений – своевременное выявление факторов риска заболеваний и их раннее предупреждение с разработкой эффективных моделей предотвращения распространенных болезней, в том числе у детей [2]. Примечательно, что во время становления системы охраны материнства и детства в нашей стране, когда началось интенсивное развитие сети ее первичных учреждений, – 1922–1930 гг. – задача победы над детским туберкулезом была одной из первых [3]. Так, необходимость скринингового обследования детского населения на туберкулезную инфекцию (ТИ) была определена еще в 1923 г., когда на II Всероссийском туберкулезном съезде в Москве, затем на заседании II Всесоюзного съезда детских врачей была утверждена инструкция по применению первого препарата для туберкулинодиагностики [4].

Туберкулез – хроническое инфекционное заболевание, не имеющее патогномичных признаков и строгой цикличности. Результатом контакта человека с *Mycobacterium tuberculosis* могут быть любые из следующих состояний: полная элиминация возбудителя, здоровое инфицирование без клинических проявлений, активный туберкулез, неактивные посттуберкулезные изменения различной степени выраженности в результате клинического излечения активного туберкулеза, хроническое течение с периодами обострений и ремиссий и острое прогрессирование с летальным исходом (так называемая, «скоротечная чахотка»). Данные проявления ТИ можно рассматривать как стадии процесса без каких-либо определенных сроков. В зависимости от количественных и качественных характеристик микобактерии и от состояния макроорганизма возможны крайние варианты этой инфекции – от практически бессимптомного инфицирования, продолжающегося всю жизнь, до тяжелого молниеносного течения с неблагоприятным исходом [5].

В конце прошлого века ученые разных стран вернулись к изучению вопроса о состоянии инфицирования *M. tuberculosis* на молекулярном уровне. Пристальное внимание стало уделяться проблемам генетики, молекулярной диагностики, патогенеза и лечения латентной ТИ [6]. Изучение данных вопросов стало актуальным и по причине доказанной перспективности профилактического направления противотуберкулезной работы в сравнении с приоритетом раннего выявления активного туберкулеза [7]. После длительного периода использования для выявления у детей туберкулезной инфекции только пробы Манту появилась возможность обследования с другими пробами и не только кожными (типа пробы с аллергеном туберкулезным рекомбинантным – АТР), но и с гамма-интерфероновыми тестами *in vitro* для выявления эффекторных Т-клеток, реагирующих на стимуляцию антигеном *M. tuberculosis*. Из таких проб в России применяется тест высвобождения гамма-интерферона (Interferon Gamma Release Assay – IGRA) T-Spot.TB [8, 9]. Этот тест определен в качестве альтернативного метода обследования, позволяющего

в случае отрицательного результата оформить медицинское заключение об отсутствии ТИ.

Сегодня встает вопрос о разработке новых биомаркеров туберкулеза, имеющих прогностическое значение для эффективности профилактики заболевания у лиц с латентной инфекцией. Сформулировано понятие «зарождающийся туберкулез» при неблагоприятном сценарии ответа на инфицирование *M. tuberculosis* в виде прогрессирования заболевания после воздействия на организм неблагоприятного фактора (события) [10, 11]. Становится очевидной актуальность вопросов, связанных с ранним выявлением инфицирования *M. tuberculosis* и разработкой эффективных мер профилактики каждого нового случая туберкулеза среди детского населения.

Цель исследования: определить место IGRA-тестов в алгоритме выявления и диагностики различных проявлений ТИ у детей и подростков.

Материал и методы

Исследование проведено в Республике Татарстан и Самарской области на базе республиканского и областного противотуберкулезных диспансеров, где с 2015 г. внедрен в клиническую практику IGRA-тест – анализ крови на туберкулезную инфекцию методом T-Spot.TB. Методика проведения теста соответствовала инструкции и заключалась в заборе крови из вены с последующим выделением из нее мононуклеарных клеток. После добавления специфических антигенов (ESAT6 и CFP10) лейкоцитарную массу помещали в специальные лунки, обработанные антителами к гамма-интерферону. После инкубации в течение суток учитывался результат – число пятен (spot) на дне лунки, которое соответствовало числу активированных Т-лимфоцитов, высвобождающих в ответ на воздействие специфических антигенов гамма-интерферон. Методика проведения теста предусматривала позитивные и негативные контроли. Регистрация восьми и более пятен соответствовала положительному результату. Исследование проведено сплошным ретроспективным методом на базе Самарского областного клинического противотуберкулезного диспансера и Республиканского клинического противотуберкулезного диспансера (г. Казань) с 2015 г. по сентябрь 2020 г. Всего выполнено 4756 тестов.

На первом этапе были изучены результаты обследования 4096 детей, чьи законные представители отказались от постановки кожных иммунологических тестов на ТИ – пробы Манту и пробы с АТР. На втором этапе проведен анализ результатов теста T-Spot.TB у 645 детей, состоявших в течение года в VI группе диспансерного наблюдения в специализированной противотуберкулезной медорганизации. Большая часть обследованных имела сопутствующую патологию: преимущественно аллергические заболевания и эндокринные расстройства в виде ожирения. Родители данных детей выражали нежелание дальнейшего наблюдения у врача-фтизиатра, в связи с чем дети были обследованы для решения вопроса о снятии их

с диспансерного учета. Третий этап исследования заключался в проведении в 2019–2020 гг. теста 15 детям, больным активным туберкулезом, которые находились на стационарном лечении.

Статистическая обработка полученных данных проходила в программе Excel: рассчитывались непараметрический критерий χ^2 (Пирсона) и отношение шансов (ОШ). Статистическая значимость различий определялась при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования

4096 детей, чьи законные представители отказались от кожных тестов, по возрастным категориям распределились следующим образом: от 1 до 2 лет – 537 (13,1 %), от 3 до 6 лет – 1631 (39,8 %), от 7 до 14 лет – 1728 (42,1 %), от 15 до 17 лет – 199 (4,9 %). Наиболее частыми причинами отказов стали религиозные мотивы (36,4 %) и боязнь осложнений из-за наличия у ребенка сопутствующей патологии (24,8 %). Несколько реже (22,6 %) встречалось негативное отношение к кожным тестам из-за сведений, полученных из различных источников (средства массовой информации, включая интернет-ресурсы). Немотивированные отказы зафиксированы в 16,2 % случаев. В целом подобная структура отказов от иммунодиагностики туберкулеза совпадает с данными, приведенными в отечественной литературе [12].

Положительные результаты теста T-Spot.TB в данной группе пациентов установлены у 113 человек – 2,8 %. Сомнительные и пограничные результаты получены в 1 % случаев (39 наблюдений). Дети с положительными результатами были направлены к врачу-фтизиатру для дальнейшего обследования и диспансерного наблюдения.

645 детей, состоявших в VI группе диспансерного учета, в зависимости от выраженности реакции на АТР разделились на две подгруппы: 428 человек с сомнительной и слабоположительной реакцией (гиперемия при отсутствии папулы или папула диаметром не более 6 мм) и 217 человек с положительной реакцией (папула диаметром 7 мм и более). Во второй подгруппе позитивные результаты теста T-Spot.TB регистрировались почти в восемь раз чаще, чем в первой (табл.): $\chi^2=114,027$, ОШ=0,055, $p=0,001$.

Почти у 70 % из этих 645 детей имела сопутствующая патология – аллергические заболевания и ожирение. У детей с отрицательными результатами теста T-Spot.TB она регистрировалась значимо чаще – в 418 наблюдениях, в то время как у детей с положительными результатами этого теста – гораздо реже, в 29 наблюдениях: 84,6 и 19,2 %; $\chi^2=54,927$, ОШ=0,028, $p=0,001$ (табл.).

У 24 детей из состоявших на диспансерном учете со стойко положительной реакцией на АТР (в т.ч. с гиперергической в 16 случаях) результаты теста T-Spot.TB изучены через год (ранее родители 15 из этих детей отказались от рекомендованного врачом-фтизиатром профилактического противотуберкулезного лечения). Во всех 24 случаях эти результаты оказались позитивными. При повторной флюорографии контактных лиц,

Таблица

Результаты теста T-Spot.TB у детей, состоявших на диспансерном наблюдении, в зависимости от результатов пробы с АТР

Реакция на АТР	Тест T-Spot.TB, кол-во наблюдений					
	Положительный		Пограничный		Отрицательный	
	абс.	% ⁶	абс.	% ⁶	абс.	% ⁶
Сомнительная ^a	33	7,7	7	1,6	388	90,7
Положительная	131	60,4	2	0,9	84	38,7
<i>Всего:</i>	164	25,4	9	1,4	472	73,2

^a Включая слабоположительную реакцию.

⁶ Доля тестов вычисляется отдельно для строк «сомнительная» (от $n=428$) и «положительная» (от $n=217$) и для строки «всего» (от $n=645$).

включая первую линию родства, в окружении троих детей были обнаружены ранее не установленные больные туберкулезом. При компьютерной томографии органов грудной клетки у пяти детей выявлены мелкие (1–2 мм) кальцинаты во внутригрудных лимфатических узлах, которые не определялись при первичном обследовании. После подтверждения диагноза латентной ТИ по результатам T-Spot.TB девять из 15 родителей, ранее отказавшиеся от профилактического противотуберкулезного лечения, дали согласие на его проведение.

Нозологическая структура активного туберкулеза у 15 детей, обследованных в 2019–2020 гг., оказалась следующей: один случай милиарного туберкулеза (ребенок 2 лет), семь случаев туберкулеза внутригрудных лимфатических узлов (ребенок 10 месяцев, два ребенка 3 лет, два ребенка 4 и 5 лет, два ребенка 9 лет), четыре случая инфильтративного туберкулеза (дети 15–17 лет) и три случая очагового туберкулеза (два ребенка 14 лет, ребенок 15 лет). В трех случаях туберкулез сочетался с ВИЧ-инфекцией: ребенок с милиарным туберкулезом и подростки с инфильтративным туберкулезом. При первичном обследовании этих детей результаты теста T-Spot.TB были положительными во всех, а реакции на пробы Манту и АТР – в 13 наблюдениях. У двух подростков 15 и 16 лет с сочетанием туберкулеза и ВИЧ-инфекции кожные пробы туберкулезными аллергенами оказались отрицательными.

Обсуждение полученных данных

Эффективность теста T-Spot.TB в скрининге туберкулеза составила 2,8 %. Сопоставление результатов этого тестирования и кожной пробы с АТР через один год наблюдения у врача-фтизиатра показало наличие отрицательного результата в 90,7 % случаев при наличии сомнительных и слабоположительных реакций на АТР. Уровень чувствительности к АТР считается критерием активности ТИ и эффективности профилактического диспансерного наблюдения. У детей, имевших стойко сохраняющиеся положительные реакции на АТР, в 100 % случаев отмечались положительные результаты теста T-Spot.TB и в 20,8 % случаев при компьютерной томографии грудной клетки выявлялись мелкие кальцинаты во внутригрудных лимфатических узлах. Тест T-Spot.TB можно считать маркером высокого риска туберкулеза у детей, т.к. флюорографическое обследование

окружения пациентов с расширением круга контактов за счет лиц непервой линии родства позволяет выявить новые случаи туберкулеза у взрослых. Кроме того, результаты кожной пробы чаще не подтверждаются этим тестом у детей, имеющих аллергические заболевания и ожирение.

У больных туберкулезом детей без признаков иммуносупрессии установлено 100 %-ное совпадение положительных результатов теста T-Spot.TB, пробы с АТР и пробы Манту. У детей, больных сочетанной инфекцией туберкулез+ВИЧ, во всех случаях установлен положительный результат теста T-Spot.TB.

Заключение

На сегодняшний день в Приволжском федеральном округе реализован технологический замысел гамма-интерфероновых тестов *in vitro* по выявлению эффекторных Т-клеток, реагирующих на стимуляцию антигеном *M. tuberculosis*. С учетом полученных нами данных может быть предложен следующий алгоритм использования различных иммунологических методов выявления ТИ у детей и подростков:

1. Скрининг детского населения на ТИ в возрасте до 7 лет включительно проводится при помощи пробы Манту, от 8 до 17 лет включительно – при помощи пробы с АТР [13].
2. В качестве альтернативного метода скринингового обследования детей, чьи законные представители отказались от рекомендованных кожных проб, может быть проведен на коммерческой основе гамма-интерфероновый тест T-Spot.TB.
3. К медицинским показаниям для назначения теста T-Spot.TB детям и подросткам следует отнести иммуносупрессию различного генеза, аллергические заболевания, ожирение.

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 – ДАК

Сбор и обработка материала – АПА, МНК

Статистическая обработка данных – ЛАБ, РХФ

Написание текста – ЛАБ, РХФ

Редактирование – ЛАБ

Литература / References

1. Федеральный закон Российской Федерации от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации». [Federal Law of the Russian Federation of 21.11.2011 No. 323-FZ "On the basics of protecting the health of citizens in the Russian Federation" (In Russ).]. URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_121895/ (Accessed 24 December 2020).
2. Баранов А.А. Профилактические технологии в педиатрии: научные и практические проблемы. *Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского*. 2003;5:1–4. [Baranov AA. Profilakticheskie tekhnologii v pediatrii: nauchnye i prakticheskie problem. *Pediatriya. Zhurnal imenu G.N. Speranskogo*. 2003;5:1–4 (in Russ).]
3. Баранов А.А., Альбицкий В.Ю. 100 лет советской системе охраны здоровья матери и ребенка: успехи, проблемы, уроки. *Вопросы современной педиатрии*. 2018;1:11–5. [Baranov AA. 100th Anniversary of the Soviet maternal and child healthcare system: Successes, problems, and lessons. *Current Pediatrics*. 2018;1:11–5 (In Russ).]
4. Модель Л.М., Сидельникова Е.Ф. *Туберкулинодиагностика*. Под ред. А.А. Киселя. М., 1926. [Model LM, Sidelnikova EF *Tuberkulinodiagnostika*. Moscow; 1926 (in Russ).]
5. Перельман М.И. *Фтизиатрия. Национальное руководство*. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. [Perelman MI. *Ftiziatriya. Nacionalnoe rukovodstvo*. Moscow: GEOTAR-Media; 2007 (In Russ).]
6. Nuermberger E, Bishai WR, Grosset JH. Latent tuberculosis infection. *Semin Respir Crit Care Med*. 2004;25(3):317–36.
7. Васильева И.А., Белиловский Е.М., Борисов С.Е., Стерликов С.А. Заболеваемость, смертность и распространенность как показатели бремени туберкулеза в регионах ВОЗ, странах мира и в Российской Федерации. *Туберкулез и болезни легких*. 2017;6:9–21. [Vasilyeva IA, Belilovsky EM, Borisov SE, Sterlikov SA. Incidence, mortality and prevalence as indicators of tuberculosis burden in WHO regions, countries of the world and the Russian Federation. Part 1. Tuberculosis incidence and prevalence. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2017;6:9–21 (In Russ).]
8. Слогодкая Л.В., Богородская Е.М. Сравнительная характеристика иммунологических тестов для выявления туберкулезной инфекции. Возможность массового скрининга. *Туберкулез и болезни легких*. 2016;5:5–16. [Slogotskaya LV, Bogorodskaya EM. Comparative description of immunological tests for tuberculous infection detection. Mass screening opportunities. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2016;5:5–16 (in Russ).]
9. Shovkun L, Aksenova V, Kudlay D, Sarichev A. The role of immunological tests in the diagnosis of tuberculosis infection in children with juvenile idiopathic arthritis (JIA). *Eur Respir J*. 2018;52:PA2733. doi: 10.1183/13993003.congress-2018.PA2733
10. Слогодкая Л.В., Синицын М.В., Кудлай Д.А. Возможности иммунологических тестов в диагностике латентной туберкулезной инфекции и туберкулеза. *Туберкулез и болезни легких*. 2019;11:46–58. [Slogotskaya LV, Sinitsyn MV, Kudlay DA. Potentialities of immunological tests in the diagnosis of latent tuberculosis infection and tuberculosis. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2019;11:46–58 (In Russ).]
11. Кудлай Д.А. Биомаркеры и иммунологические тесты. Экспериментально-клинические параллели латентной туберкулезной инфекции. *Туберкулез и болезни легких*. 2020;98(8):63–74. [Kudlay DA. Biomarkers and immunological tests. Experimental and clinical parallels of latent tuberculosis infection. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2020;98(8):63–74 (In Russ).]
12. Казыкина Т.Н., Стерликов С.А., Борисова Е.С., Грипекина Н.В., Долженко Е.Н., Еленкина Ж.В. и др. Проблема отказов от иммунодиагностики туберкулеза: результаты многоцентрового социологического исследования. *Туберкулез и болезни легких*. 2020;98(4):40–7. [Kazykina TN, Sterlikov SA, Borisova ES, Gripekina NV, Dolzhenko EN, Elenkina ZhV, et al. The problem of refusal from immunodiagnosis of tuberculosis: results of a multi-center sociological study. *Tuberculosis and Lung Diseases*. 2020;98(4):40–7 (In Russ).]
13. Приказ Минздрава России от 21.03.2017 № 124н «Об утверждении порядка и сроков проведения профилактических медицинских осмотров граждан в целях выявления туберкулеза». [Order of the Ministry of Health of Russia dated March 21, 2017 No. 124n "On approval of the procedure and timing for conducting preventive medical examinations of citizens in order to detect tuberculosis" (In Russ).] URL: <http://base.garant.ru/71688450/> (Accessed 24 December 2020).