

Оригинальная статья: Опыт применения аллергена туберкулезного рекомбинантного (ДИАСКИНТЕСТ®) и квантиферонового теста в определении активности туберкулезной инфекции у детей

А.А. Старшинова, Н.В. Корнева, И.Ф. Довгалюк

ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии Минздрава России»
России, Санкт-Петербург, Россия

Низкая информативность туберкулинодиагностики у детей приводит к несвоевременному выявлению заболевания, в 58% случаев на фазах обратного развития. Внедрение в практику новых более информативных иммунологических тестов определения активности туберкулезной инфекции является первостепенной задачей современной фтизиопедиатрии. В клинике детской фтизиатрии за период 2010-2012 гг. обследовано 114 пациентов с подозрением на локальную форму туберкулеза. Проведенное проспективное исследование доказало высокую информативность Диаскин-теста (83,5%) по сравнению с пробой Манту 2ТЕ в два раза (52,1) и рекомендовать его как более значимый метод раннего выявления туберкулезной инфекции у детей. Результаты Диаскин-теста в 95% подтверждены проведением Квантиферонового теста (КФ), делает необходимым его проведение только у детей сотягощенным аллергологическим фоном. Положительный Диаскин-тест свидетельствует о наличии активности туберкулезной инфекции, что требует проведения качественного лучевого исследования, для исключения локальной формы заболевания.

Среди выявляемых клинических форм туберкулеза у детей преобладает поражение внутригрудных лимфатических узлов от 65,4%-72,5% [12], которые выявляются в настоящее время в 58% случаев на фазах обратного развития, что свидетельствует о поздней диагностике специфического процесса [3,5]. Одним из распространенных тестов, используемых в скрининговом обследовании детского населения на туберкулез, является кожный туберкулиновый тест, однако в 60% случаев чувствительность к туберкулину остается нормергической уже при заболевании ребенка [1]. Трудности в оценке пробы Манту 2ТЕ связаны с распространением факторов, влияющих на чувствительность к туберкулину: повышенной аллергизация детей, увеличения распространенности сопутствующей патологии, которые осложняют оценку истинной активности туберкулезной инфекции [2].

Применение надежных методов определения истинной активности туберкулезной инфекции, которые позволят своевременно оценить состояние ребенка, инфицированного МБТ, обеспечить качественное обследование и, в последующем, адекватное лечение, является необходимым в условиях неблагоприятной ситуации по туберкулезу [1,2,9,11].

Цель исследования – определить информативность современных иммунологических тестов в определении активности туберкулезной инфекции у детей с туберкулезом внутригрудных лимфатических узлов.

Материалы и методы

За период с 2010-2012гг. в отделении детской фтизиатрии проведено проспективное исследование 114 детей с подозрением на локальную форму туберкулеза внутригрудных лимфатических узлов (ТВГЛУ).

В группу обследованных были включены дети младшего (от 3 до 6 лет) – 46 (40,4; $m=4,5\pm 0,2$) и среднего возраста (от 7 до 14 лет) – 68 (59,6; $m=12,3\pm 0,3$). Больше половины обследованных были инфицированы МБТ

на протяжении 2 - 5 лет (64,8%; 74 больных), в 21,1%(24 больных) - более 5 лет и только 16 детей (14,1 %) человек находились в раннем периоде инфицирования МБТ. В 64,9%(74 больных) случаев пациенты выявлены по нарастанию чувствительности к туберкулину, в 30,7%(35 больных) по контакту с больным туберкулезом, по предъявлению жалоб в 4,0% (5 больных). По данным анамнеза, все дети были вакцинированы БЦЖ в родильном доме, из них эффективно 62(54,3%) ребенка, о чем свидетельствовал поствакцинный рубец более 4мм. Проявления интоксикационного синдрома отсутствовали или были умеренными, более чем в половине случаев (68,4%; 78 детей).

С целью постановки диагноза, в стационаре был проведен стандартный комплекс фтизиатрического обследования, дополненный углубленной туберкулинодиагностикой (пробой Манту в стандартных разведениях 0,1(V), 0,01(VI)), комплексом серологических реакций (реакция непрямо́й гемагглютинации (РНГА), реакция пассивного гемолиза (РПГ), реакция потребления комплемента (РПК), иммуноферментный анализ (ИФА)) [8,4,6] и лучевыми методами диагностики (многосрезовая спиральная компьютерная томография (МСКТ) и МСКТ- ангиография (МСКТ-АГ)) с применением спирального компьютерного томографа с многорядным детектором (многосрезовый) «Aquilion-32» (Toshiba Medical Systems Corporation, Japan), с внутривенным болюсным введением контрастного вещества через инжектор автоматический «СТ 9000 ADV» (Liebel-Flarshein (Mallincrodt Inc.).

Кроме того проведен анализ результатов туберкулиновой кожной пробы Манту 2 ТЕ, путем введения очищенного туберкулина в стандартном разведении (готовая форма), и пробы с аллергеном туберкулезным рекомбинантным в стандартном разведении – Диаскин-теста (ДСТ) [7,10]

До постановки указанных проб была взята венозная кровь для проведения Квантиферонового теста

(QuantiFERON®-TB), который является референтным методом и позволил качественно оценить их информативность. Набор QuantiFERON®-TB Gold In-Tube предназначен для диагностики туберкулеза *in vitro*. Метод основан на использовании стимулирующей смеси белков ESAT-6, CFP-10 и TB7.7 (тест-система «Тубинферон» (ТУ 9398-001-88410295-2010 ООО «МонА» г. Москва, № ФСР 2011/11269) - набор реагентов для иммунологического определения туберкулезного инфицирования по индукции интерферона гамма *in vitro* в присутствии специфических антигенов микобактерий туберкулеза) для стимуляции клеток гепаринизированной цельной крови. Количественное определение интерферона гамма (IFN- γ) методом иммуноферментного анализа (ELISA, ИФА) используется для выявления *in vitro* клеточного ответа на стимуляцию этими пептидными антигенами, ассоциированными с инфекцией *Mycobacterium tuberculosis*.

Статистическая обработка материала проведена с помощью непараметрических методов с учетом статистической значимости различий по U-критерию Манна-Уитни. Количественные данные оценивались в виде $M \pm m$, где M-среднее арифметическое, m- ее стандартная ошибка. Степень связи между изучаемыми признаками определяли с помощью коэффициента корреляции по формуле Пирсона (r) для количественных данных. Различия или показатели связи считались значимыми при уровне $p < 0,05$. Использовался ранговый коэффициент корреляции Спирмена. Обработка материала проводилась с использованием программы Microsoft Office Word Excel 2007, Statistica 8.

Результаты и обсуждение

Чувствительность к туберкулину (реакции Манту с 2ТЕ) имела нормергический характер в 64,1%(73; $m=12,3 \pm 0,2$) случаев, при этом у 18 человек отмечался низкий уровень специфической сенсibilизации ($m=5,5 \pm 0,2$), гиперергическая чувствительность отмечена у 23 (20,1%) детей.

В комплексе серологических реакций титр специфических антител (все реакции) был ниже диагностического в 57,9%случаев (66 пациентов), в 28,9% случаев (33 пациентов) наблюдался положительный титр по одной и двум реакциям, что возможно при наличии инфицирования МБТ, в 13,2%(15 случаев) - по трем и четырем реакциям, что свидетельствовало об активности туберкулезной инфекции.

При анализе стандартного рентгенологического комплекса по обзорной рентгенограмме у 54 человек (47,4%) выявлено нарушение структуры корней, по линейным томограммам. «косвенные признаки» реакции ВГЛУ определялись в 57,1%(65 человек) - бронхопультмональной группы, в 32,5%(37 человек)- парааортальной, значительно реже паратрахеальной

- в 10,5%(12 человек) и бифуркационной - в 5,3%(6 человек). У 21 ребенка было подозрение на отложение кальция в проекции ВГЛУ, у 21 человек (18,4%) - на очаговые изменения в легочной ткани. Результаты рентгенологического и клиничко-лабораторного обследования (умеренный и выраженные признаки активности туберкулезной инфекции, а также подозрение на увеличение ВГЛУ) послужили основанием для проведения МСКТ и МСКТ-ангиографии (при подозрении на увеличение ЛУ бронхопультмональной группы).

При лучевом (МСКТ и МСКТ-ангиографии) исследовании в 27,2%(31 человек) случаев визуализировались единичные лимфатические узлы (ЛУ) от 0,2 до 0,4см в поперечном размере, обычной структуры и плотности. В 44,7%(51 человек) случаев диагностировались единичные и множественные ЛУ от 0,5 до 1,2см обычной структуры и плотности, чаще всего в бронхопультмональной (10,5%;12 человек) ($m=0,68 \pm 0,1$) и трахеобронхиальной (10,5%;12 человек) ($m=0,61 \pm 0,04$) групп, реже паратрахеальной (9,6%;11 человек) ($m=0,65 \pm 0,02$), бифуркационной (7,9%;9 пациентов) ($m=0,62 \pm 0,01$) и парааортальной (6,1%;7 человек) ($m=0,61 \pm 0,2$) групп. Отложение извести во внутригрудных лимфатических узлах выявлено у 39 (34,2%) пациентов, что в два раза больше чем при стандартном исследовании. У 17 человек определялись субплеврально расположенные очаги в легочной ткани до 0,3см в диаметре, в 23,5(4 пациента) - кальцинированные.

На основании комплексного обследования диагноз не нашел своего подтверждения у 47 (41,2%) детей (I группа - инфицированные МБТ). В 58,7%(67) (II группа) поставлен диагноз локальной формы туберкулеза ВГЛУ.

Всем обследованным проведен ДСТ и взята венозная кровь для КФ-теста. У 53 (46,6%) человек ДСТ тест был отрицательным, у 5 (4,3%) - сомнительный ($m=3,2 \pm 0,1$) и у 56 (49,1%) (12,7; $m=18,0 \pm 0,3$) положительный. КФ-тест в 56,1%(64) показал отрицательный результат, в 42,1%(48 пациентов) - положительный, в 1,8% (2 пациента) - сомнительный, что в 87,5% подтверждал положительный результат ДСТ и позволил определить дифференцированный подход к назначению КФ

Анализ полученных результатов по реакции Манту 2ТЕ, приведенных в таблице №1, показывает отсутствие достоверных различий чувствительности у больных локальной формой туберкулеза и инфицированных МБТ детей. Несмотря на преобладание высоких результатов реакции Манту 2ТЕ в группе больных, практически в 75% случаев отмечается нормергическая чувствительность во II и в 87% в I группе наблюдения.

Выраженные проявления интоксикационного синдрома во II группе отмечались достоверно чаще, чем I группе (61,2 против 21,3%, $\chi^2 = 17,8$, $p < 0,001$). В 29,9%(20

Таблица №1. Результаты иммунологических тестов в группах наблюдения

Иммунологические тесты	проба Манту 2ТЕ			Диаскин-тест			Квантифероновый тест		
	Низкая	средняя	Высокая	Отриц.	Сомнит.	Положит.	Отриц.	Сомнит.	Положит.
I группа (n=47) Инфицированные МБТ	17,1(8) m=5,5±0,2	70,2(33) m=12,3±0,2	12,7(6) m=18,0±0,3	80,9(38)* p<0,001	6,4(3)	12,8(6) m=15,3±0,2	95,7(45)* p<0,01	4,3(2)	-
II группа (n=67) Локальная форма туберкулеза	14,9(10) m=6,4±0,2	59,7(40) m=13,03±0,3	25,4(17) m=17,9±0,2	22,4(15)	2,01(2)	74,6(50)* m=17,2±0,3 p<0,001	28,4(19)	-	71,6(48)* p<0,001
Всего (n=114)	15,8(18)	64,1(73)	20,1(23)	46,6(53)	4,3(5)	49,1(56)	56,1(64)	1,8(2)	42,1(48)

*-достоверные результаты при сравнении групп наблюдения I и II

имели место умеренные его проявления, однако чувствительность к туберкулину по реакции Манту 2ТЕ оставалась нормергическая (59,7%(40); m=13,03±0,4) и низкая (14,9% (10); m=6,4±0,2) и в 25,4% (17; m=17,9±0,2)-высокая, что существенно не отличается от показателей специфической сенсibilизации в I группе наблюдения (таблица№1).

В сравнении с I группой с учетом уровня статистической значимости различий использовался непараметрический U-критерий Манна-Уитни (p=0.05), где нормергическая чувствительность к туберкулину во II группе определялась достоверно часто (p<0,02), также как низкая и нормергическая чувствительность по градуированной кожной пробе (p<0,01), что свидетельствует о низкой информативности данных тестов.

Выявлена тесная корреляционная связь высокой чувствительности к туберкулину и сроков инфицирования МБТ (r=0,63), что объясняет нарастание чувствительности к туберкулину уже на фазах обратного развития специфического процесса и способствует позднему направлению детей для комплексного фтизиатрического обследования.

Во II группе в 74,6%(50; m=17,2±0,2) ДСТ был положительным, что достоверно выше в сравнении с I группой наблюдения (74,6 против 12,8, $\chi^2 = 34,8$, p<0,001). В тоже время в I группе наблюдения, у здоровых детей, достоверно чаще определяется отрицательный ДСТ (80,9 против 22,4, $\chi^2 = 46,7$, p<0,001).

КФ-тест показал (таблица№1) положительный результат во II группе детей в 71,6%(48) случаев, в I группе положительных результатов не было. В 95,7%(48) случаев у здоровых детей (I группа) тест был - отрицательным, что достоверно выше, чем в II группе (95,7 против 28,4, $\chi^2 = 10,6$, p<0,01). Отрицательные результаты ДСТ и КФ-теста наблюдались при фазе кальцинации специфического процесса, характерного при отсутствии активности туберкулезного процесса.

Расчитаны показатели информативности (диагностическая чувствительность (ДЧ), диагностическая специфичность (ДС), диагностическая эффективность (ДЭ)

и прогностическая ценность положительного результата (ПЦПР), прогностическая ценность отрицательного результата (ПЦОР) примененных методов. Проба Манту 2ТЕ имеет: ДЧ-87,1, ДС-17,1, ДЭ – 52,1, ПЦПР – 50%, ПЦОР –44,4%, что указывает на возможность неправильной оценки активности туберкулезной инфекции у половины пациентов и обосновывает применение новых более информативных методов. Эти показатели для Диаскин-теста составили: (ДЧ-80,7, ДС-86,4, ДЭ – 83,5 ПЦПР – 89,3%, ПЦОР -71,1%; для КФ-теста - ДЧ-71,6, ДС-95,7, ДЭ – 83,6 ПЦПР – 100 %, ПЦОР -70,3%.

Положительный КФ подтверждает ДСТ в 95,8%, информативность этих методов одинакова (83,6%). Это позволяет рекомендовать применение ДСТ в стандартном комплексе фтизиатрического обследования, а КФ – только по показаниям, у детей с отягощенным аллергологическим анамнезом.

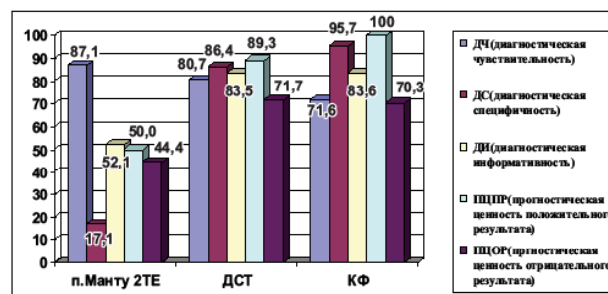


Рис.1 Показатели информативности иммунологических методов

Выводы:

1. Наиболее информативными в определении активности туберкулезной инфекции являются Диаскин-тест и КФ-тест в сравнении с пробой Манту 2ТЕ (52,1);
2. Квантифероновый тест подтверждает результаты Диаскин-теста в 95%, что подтверждает его информативность и позволяет рекомендовать его как метод ранней диагностики туберкулеза при наличии противопоказаний к применению ДСТ у ограниченного контингента детей;
3. Использование в комплексе диагностики Диаскин-теста позволяет повысить эффективность

определения активности туберкулезной инфекции, в сравнении с туберкулинодиагностикой в два раза;

4. Положительные результаты иммунологических тестов требуют лучевого обследования (МСКТ и МСКТ-ангиографии), что позволит качественно определить или исключить специфические изменения во внутригрудных лимфатических узлах и легочной ткани;

Клинический пример № 1.

Ребенок С. (5л.), направлен в отделение детской фтизиатрии с подозрением на ТВГЛУ бронхопьюльмональной группы в фазе инфильтрации. Ребенок из неустановленного контакта с больным туберкулезом, эффективно вакцинирован БЦЖ в роддоме. Анамнез отягощен пищевой аллергией, симптомы интоксикации отсутствовали. Выявлена высокая чувствительности к туберкулину (р16мм), однако отрицательный ДСТ, что отражено на рисунке №1, и КФ-тест не подтвердили наличие активности туберкулезной инфекции. Высказанные подозрения, при рентгеномографическом обследовании, на увеличение ВГЛУ бронхопьюльмональной группы, не нашли своего подтверждения по результатам МСКТ и МСКТ- ангиографии.

По данным комплексного обследования диагноз туберкулез ВГЛУ был исключен.



Рис. 1. Результаты пробы Манту 2ТЕ и ДСТ

Клинический пример №2.

Ребенок П.(4 г.), направлен в отделение детской фтизиатрии с подозрением на туберкулез ВГЛУ в фазе инфильтрации. Ребенок был направлен в ПТД как ребенок из семейного контакта с больным туберкулезом. Эффективно вакцинирован БЦЖ при рождении. Симптомы интоксикации выражены умеренно. По результатам рентгеномографического обследования в ПТД заподозрена реакция со стороны

ВГЛУ. Высокая степень специфической сенсибилизации с гиперергической реакцией на туберкулин нашла свое подтверждение по результатам ДСТ - гиперергический (р22мм), что отражено на рисунке №2, КФ-тест положительный. Титры специфических антител ниже диагностического уровня по всему спектру серологических реакций. Результаты МСКТ и МСКТ-ангиографии выявили увеличение размеров ВГЛУ более 1,0см в паратрахеальной, бифуркационной, бронхопьюльмональной группах. Диагноз: туберкулез внутригрудных лимфатических узлов паратрахеальной, бифуркационной бронхопьюльмональной группы в фазе инфильтрации. МБТ(-).



Рис. 2. Результаты пробы Манту 2ТЕ и ДСТ

Заключение

Низкая информативность туберкулинодиагностики у детей приводит к несвоевременному выявлению заболевания, в 58% случаев на фазах обратного развития. Внедрение в практику новых более информативных иммунологических тестов определения активности туберкулезной инфекции является первостепенной задачей современной фтизиопедиатрии. В клинике детской фтизиатрии за период 2010-2012 гг. обследовано 114 пациентов с подозрением на локальную форму туберкулеза. Проведенное проспективное исследование доказало высокую информативность Диаскин-теста (83,5%) по сравнению с пробой Манту 2ТЕ в два раза (52,1) и рекомендовать его как более значимый метод раннего выявления туберкулезной инфекции у детей. Результаты Диаскин-теста в 95% подтверждены проведением Квантиферонового теста (КФ), делает необходимым его проведение только у детей с отягощенным аллергологическим фоном. Положительный Диаскин-тест свидетельствует о наличии активности туберкулезной инфекции, что требует проведения качественного лучевого исследования, для исключения локальной формы заболевания.

Литература

1. Выявление туберкулеза и тактика диспансерного наблюдения за лицами из групп риска по заболеванию туберкулезом с использованием препарата «Диаскинтест» / В.А. Аксенова [и др.] // Туберкулез и болезни легких. – 2010. – № 2. – С. 13–19.
2. Диаскинтест при оценке активности туберкулеза у детей и подростков / В.А. Аксенова [и др.] // Туберкулез и болезни легких. – 2009. – № 10. – С. 13–16.
3. Довгалюк, И.Ф. Клинико-эпидемиологические особенности туберкулеза у детей Северо-Запада Российской Федерации / И.Ф. Довгалюк, Н.В. Корнева // Туберкулез и болезни легких. - 2011.-№3.- С.12-16.
4. Клинико-лабораторные (иммунобиохимические) методы в диагностике, определении активности и выборе тактики лечения различных проявлений туберкулезной инфекции от инфицирования до локальной формы с осложненным течением: Пособие для врачей/ Сост. И.Ф. Довгалюк, Ю.Э. Овчинникова, М.Н. Кондакова, М.Е. Дьякова, Е.И. Потапенко. – СПб., 1999.- 21с.
5. Клиническая и рентгенологическая характеристика впервые выявленного туберкулёза внутригрудных лимфатических узлов у детей / Е.С. Овсянкина [и др.] // Пробл. туберкулёза и болезней лёгких. - 2007. - №1. - С.3-5.
6. Критерии эффективности лечения туберкулеза внутригрудных лимфатических узлов у детей с использованием иммуногенетических тестов/И.Ф.Довгалюк [и др.]//Медицинская технология.-2010.-24с.
7. Кожная проба с препаратом Диаскинтест® (аллерген туберкулезный рекомбинантный 0,2мкг в 0,1мл раствор для внутрикожного введения) для идентификации туберкулезной инфекции: Пособие для врачей/ Сост. Б.Л. Медников, Л.В. Слогодкая.- М.,2009.- 32с.
8. Определение состояния иммунитета и уровня цитокинов для оценки течения туберкулеза легких: Пособие для врачей/ Сост. Б.Э. Кноринг, Н.М.Чужова, И.Я.Сахарова, Е.М. Леонченко, Т.Б. Ряснянская. -СПб., 1998.-21с.
9. Опыт применения нового кожного теста (Диаскинтеста®) для диагностики туберкулеза органов дыхания у детей и подростков в туберкулезном отделении/ Е.С. Овсянкина и [др.] // Пробл. туберкулёза и болезней лёгких. - 2009.- №1.-С.16-19.
10. Рекомендации по применению кожной пробы с препаратом аллерген туберкулезный рекомбинантный 0,2 мкг в 0,1мл раствор для внутрикожного введения (ДИАСКИНТЕСТ®) для идентификации туберкулезной инфекции у детей и диспансерного наблюдения в противотуберкулезных учреждениях/ Е.С.Овсянкина [и др.]//Методические рекомендации №26.-2010.- 29с.
11. Слогодкая, Л.В. Диаскинтест- новый метод выявления туберкулеза / Л.В. Слогодкая, Я.А. Кочетков, А.В. Филинов // Туберкулез и болезни легких.- 2011. -№6.- С.17-22.
12. Туберкулез в Российской Федерации 2010год/ Аналитический обзор статистических показателей, используемых в российской федерации.- М., 2011.- 279с.