

Туберкулинодиагностика и новые тесты для выявления инфекции

В «МВ» № 7, 9 за 2013 год опубликованы 2 статьи — профессором А.М. Королюка, В.Н. Кривожица «Диаскинтест и туберкулиновая проба: вместо или вместе» и профессора И.В. Красильникова «Прошлое и настоящее туберкулинодиагностики». Мне хотелось бы по diskutieren с авторами статей относительно эффективности туберкулинодиагностики и новых иммунологических тестов со специфическими белками, применяемыми как в тестах *in vitro*, так и *in vivo* (кожный тест с препаратом Диаскинтест), для выявления туберкулезной инфекции. (Курсивом помечены выдержки из вышеназванных статей.)



Л.В. СЛОГОЦКАЯ,
доктор медицинских наук, лауреат премии Правительства РФ в области науки и техники, заведующая научно-клиническим отделом ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом ДЗ г. Москвы»,
ученый секретарь ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом ДЗ г. Москвы»

«Разработчики Диаскинтеста всегда подчеркивают, что используемые антигены ESAT-6 и CFP-10 специфичны только для *Mycobacterium tuberculosis*, но отсутствуют у вакцинного штамма *M. bovis BCG* и большей части нетуберкулезных микобактерий (НТМБ). Что и обуславливает высокую специфичность кожного ДСТ» (А.М. Королюк, В.Н. Кривожица).

Это факт, известный всем исследователям, занимающимся данной проблемой, в первую очередь микробиологам, генетикам и иммунологам. После расшифровки в 1998 году генома *M. tuberculosis* появилась возможность использовать отдельные специфичные для *Mycobacterium tuberculosis* белки для диагностики туберкулеза. Два наиболее широко применяющихся в диагностических целях, причем в первую очередь в клеточных тестах *in vitro*, антигена (ESAT-6 и CFP-10) закодированы в зоне RD1 генома *M. tuberculosis*, и что важно — они экспрессируются при размножении микобактерий и отсутствуют в *M. bovis BCG* и большинстве нетуберкулезных микобактерий. Они связаны с вирулентностью *Mycobacterium tuberculosis*. В связи с этим ESAT-6 и CFP-10 были использованы при разработке специфических диагностических тестов для выявления туберкулезной инфекции. Открытие антигенов, специфичных для

M. tuberculosis, привело к разработке тестов *in vitro*, основанных на продукции гамма-интерферона (ИФН) Т-лимфоцитами в ответ на стимуляцию этими антигенами (IGRA—Interferon—Gamma Release Assays). Один из них, QuantiFERON (QFT), его поздняя версия QuantiFERON-TB Gold In-Tube (QFT-GIT), (Cellestis, Victoria, Australia), использует твердофазный иммуносорбентный анализ для измерения антиген-специфичной продукции интерферона циркулирующими Т-клетками в цельной крови. Другой тест, T-SPOT.TB (Oxford Immunotec, Oxford, United Kingdom), использует технику Elispot для измерения количества моноклеарных клеток периферической крови, продуцирующих интерферон (ИФН).

Недостатками лабораторных тестов IGRA является то, что они дорогостоящие и трудновыполнимые, поскольку для их проведения требуется лабораторное оснащение и квалифицированный персонал. Кроме того, необходимы внутривенные манипуляции и условия для сохранения жизнеспособности Т-лимфоцитов крови, взятой у пациента. Вместе с тем такой тест должен быть недорогим, хорошо воспроизводимым и легко оцениваемым, пригодным для широкомасштабного применения. В России был разработан препарат Диаскинтест® (ДСТ), который представляет собой комплекс рекомбинантных белков CFP-10 — ESAT-6, продуцируемых *Escherichia coli* BL21(DE3)/pCFP-ESAT. Он предназначен для внутрикожного применения — техника не отличается от пробы Манту, доза 0,2 мкг в 0,1 мл.

«Высокая оценка эффективности отечественных авторов контрастирует со сдержанным подходом специалистов США к иммунологическим тестам, основанным на реакциях с теми же генно-инженерными белками CFP10 и ESAT-6, которые являются базовыми в отечественном препарате ДСТ. Речь идет о двух известных методиках IGRA» (А.М. Королюк, В.Н. Кривожица).

Проба с ДСТ является маркером активности туберкулезной инфекции с наибольшим риском заболевания

Однако многочисленные исследования на протяжении 15 лет свидетельствуют об обратном. В обзорах D. Menzies и соавторов (2007), M. Pai и соавторов (2008), K. Steingart и соавторов (2009), R. Diel и соавторов (2010) сравнивалась чувствительность, специфичность тестов IGRA по сравнению с туберкулиновой кожной пробой. Эти тесты показали высокую специфичность (почти 100%). Первые же данные по применению кожного пробы с ДСТ

показали высокую, почти 100%-ную специфичность, иначе говоря, положительные реакции отсутствовали после вакцинации БЦЖ при нетуберкулезных заболеваниях и завершившемся туберкулезном процессе.

Различия в оценке международных экспертов вызваны только в отношении чувствительности тестов при латентной туберкулезной инфекции (ЛТИ), поскольку пока не создана адекватная модель ЛТИ. Поскольку не существует готового золотого стандарта для диагностики латентной туберкулезной инфекции, следовательно, возникают большие трудности в установлении чувствительности (так же как и специфичности) проб. При отсутствии золотого стандарта латентной туберкулезной инфекции для оценки чувствительности используется в качестве «суррогата» впервые выявленный активный туберкулез. Однако это недостаточно адекватный «суррогат» из-за известного снижения клеточного иммунитета при заболевании туберкулезом, особенно на момент постановки диагноза. Уже в первые годы применения туберкулина было отме-

туберкулез выявлен у 4,9%; положительные реакции на пробу с ДСТ отмечены у 5,6%, а туберкулез среди них выявлен у 62,5%. У детей и подростков, контактировавших в учебном заведении с больными туберкулезом без бактериовыделения, частота положительных реакций достоверно ниже — всего 2,2% ($p < 0,001$); на пробу Манту частота положительных реакций составила 86,1% и не отличалась от таковой у контактов с бактериовыделителями.

Что касается чувствительности тестов IGRA у больных туберкулезом, то она выше, чем туберкулиновых проб. В обзорной статье [Menzies D., Pai M., Comstock G. Meta-analysis: new tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendations for research// Ann Intern Med. — 2007. — Vol. 146. p. 340—354] приводятся данные чувствительности 2 тестов IGRA и туберкулиновой пробы — соответственно 88%, 76% и 70%. Чувствительность туберкулиновой пробы можно повысить до 73 и 80% путем снижения пороговых значений положительных

Первые же данные по применению кожного пробы с ДСТ показали высокую, почти 100%-ную специфичность теста

чено наличие «отрицательной энергии» — отсутствие кожного реакции при тяжелом течении туберкулеза. В дальнейших исследованиях это подтвердилось.

По результатам наших исследований, частота положительных реакций на пробу с ДСТ при латентной туберкулезной инфекции у детей и подростков, наблюдаемых в диспансерных группах риска, соответствует степени риска развития заболевания, достигая максимума у лиц с виражом реакций на пробу Манту из семейного контакта с больными туберкулезом — бактериовыделителями — 94,9% (95% ДИ 87,9—100%), что достоверно выше, чем в других группах риска (при попар-

реакций с 15 мм (как это принято, например, в США) до 10 и 5 мм соответственно, но за счет снижения специфичности. Как известно, в России пороговое значение составляет 5 мм.

Кожная проба с ДСТ обладает высокой чувствительностью: частота положительных реакций у детей и подростков с нелеченным туберкулезом органов дыхания составила 97,3% (95% ДИ 94,9—99,6%); отрицательные реакции отмечались в тех случаях, когда дети непосредственно сразу после рождения с еще несформированным иммунитетом попадали в очаг массивной туберкулезной инфекции. При этом реакции на пробу Манту у них также были отрицательными.

А.М. Королюк, В.Н. Кривожица пишут, что, «оставаясь на общепринятых иммунологических позициях, трудно представить, что специфичность и результативность кожного аллергической пробы на эти антигены (Диаскинтест) намного превосходили аналогичные тесты *in vitro*».

Кожные тесты повышенной чувствительности замедленного типа более эффективны, поскольку тесты IGRA определяют *in vitro* только образование ИФН циркулирующими Т-клетками в ответ на специфичные антигены *M. tuberculosis*, а в кожных пробах задействованы CD4+ и CD8+ Т-клетки, а также цитокины, и в частности, фактор некроза опухоли- α (ФНО- α) и др.

ном сравнении $p < 0,001$ по критерию 2). Частота положительных реакций на пробу Манту в группах значимо не различалась, приближаясь к 100%.

Проба с ДСТ является маркером активности туберкулезной инфекции с наибольшим риском заболевания: при обследовании подростков из близкого контакта с больными туберкулезом — бактериовыделителями положительные реакции на пробу Манту отмечены у 77,9% из них, а

Кожные пробы со специфическими антигенами ESAT-6 и CFP-10 (Диаскинтест) сопоставимы по высокой специфичности и чувствительности с тестом QuantiFERON-TB Gold In-Tube (QFT). Результаты проведения обоих тестов демонстрируют высокую степень согласованности между собой (совпадение в 94,3% случаев, коэффициент каппа $0,709 \pm 0,104$, $p=0,000$). Частота дискордантных реакций в данном исследовании отмечена всего у 7 больных — 5,7%. Реверсия реакции на пробу с ДСТ до отрицательных значений отмечена у 5 человек (что соответствовало динамике клинкорентгенологической картины), но у 3 из них отмечена положительная реакция QFT.

А.М. Королюк, В.Н. Кривожиж считают пробу Манту более эффективной для выявления инфицированности и заболевания туберкулезом и приводят в подтверждение своего мнения следующие данные: ссылаясь на аналитический обзор по России за 2010 год, указывают, что с помощью этой пробы было выявлено 50% случаев туберкулеза у детей, а по данным аналитического обзора по С.-Петербургу, у 20% подростков.

Трудно согласиться, что это показатели высокой эффективности.

Авторы приводят также данные по Санкт-Петербургу относительно инфицированности на основе числа положительных реакций на пробу Манту: 27,4% у детей и 54% у подростков. Но численность положительных реакций на пробу Манту не означает инфицированности, а свидетельствует о наличии иммунного ответа, который наступает как в ответ на вакцинацию, так и на инфицированность туберкулезными и нетуберкулезными микобактериями. Повсеместное внедрение вакцинации БЦЖ (*M. bovis* BCG) резко снизило специфичность туберкулиновых тестов из-за перекрестной

сенсбилизации организма вирулентным и вакцинным штаммами. Вакцинный штамм *M. bovis* BCG оставляет длительный иммунологический ответ после предполагаемого полного выведения из организма. У детей, вакцинированных при рождении, положительная реакция на пробу Манту может сохраняться до 10 лет, в зависимости от вакцинного штамма, и может наблюдаться даже на протяжении более длительного периода, если проводилась повторная вак-

Манту отмечены у 703 699 (62,7%) детей и 134 247 (74,2%) подростков. Для уточнения характера туберкулиновой чувствительности на дообследование в противотуберкулезный диспансер направлено 104 097 детей и 12 432 подростка, т.е. всего 14,8% детей и 9,3% подростков от всех имевших положительную реакцию. Таким образом, более чем в 90% случаев положительные реакции расценены как поствакцинальные еще до направления в диспансер лиц

Кожная проба с ДСТ обладает высокой чувствительностью: частота положительных реакций у детей и подростков с нелеченным туберкулезом органов дыхания составила 97,3%

цинация или повторная туберкулиновая проба. Положительные реакции на пробу Манту сохраняются длительно также после инфицирования туберкулезными и нетуберкулезными микобактериями (НТМБ).

В большинстве европейских стран туберкулинодиагностика как массовый скрининг отменена и применяется только в группах риска. В Белоруссии с 2011 года пробу Манту у детей проводят только в группах риска по заболеванию туберкулезом, а с 2013 года вместе с этой пробой проводится проба с ДСТ.

В России в условиях массовой вакцинации БЦЖ детей при использовании 2 ТЕ ППД-Л и низком пороговом значении положительных реакций (5 мм) отмечается низкая специфичность туберкулиновых проб. Так, в Москве в 2008 г. были обследованы методом туберкулинодиагностики 1 121 675 детей и 18 081 подросток. Среди них положительные реакции на пробу

с такими реакциями. После обследования в диспансере на учет в группы повышенного риска взято 11 469 детей и 665 подростков, т.е. соответственно 1,6 и 0,5%, выявленных с положительными реакциями на туберкулин. Детей и подростков с выражением туберкулиновых реакций (6-А группа) было 0,8 и 0,2% соответственно, с гиперергией реакций (6-Б группа) — по 0,1%, с усилением реакций (6-В группа) по 0,1%. Таким образом, эффективность туберкулинодиагностики с целью отбора в группы риска составила 1% у детей и 0,4% у подростков. Среди детей выявлено 127 больных локальными формами туберкулеза, и только 64 (50,4%) из них — методом туберкулинодиагностики. У подростков эти цифры еще ниже — 2 из 57 (3,5%). Такие данные отмечаются из года в год с незначительными колебаниями.

И.В. Красильников пишет, что только на основании пробы Манту проводится

отбор детей на вакцинацию и ревакцинацию.

Что касается вакцинации и ревакцинации, то отсроченная вакцинация и ревакцинация в 7-летнем возрасте будут проводиться по-прежнему по пробе Манту, а в подростковом возрасте, в связи с высокой частотой положительных реакций на эту пробу, количество подлежащих ревакцинации столь незначительно, что большинство педиатров считают, что ее можно отменить. Некоторые авторы считают ошибочной практику отбора на ревакцинацию лиц с отрицательной туберкулиновой реакцией, поскольку отсутствие реакции не означает отсутствие иммунологической памяти и противотуберкулезной защиты. Признаки усиления иммунных реакций после ревакцинации указывают на устойчивую иммунологическую память при ослабленной реакции на туберкулин.

Приостановили вакцинацию БЦЖ в местной популяции детей в большинстве развитых европейских стран. По результатам опроса EuroTB в 2005, в 12 странах БЦЖ по-прежнему проводят при рождении ребенка, и в четырех странах ревакцинацию один или несколько раз. В пяти странах проводят вакцинацию детей более старшего возраста, до достижения школьного возраста, и в 10 странах проводят вакцинацию лишь в определенных группах риска.

Имеется ограниченный объем данных по распространенности микобактериальной инфекции или микобактериоза в Европе, но приводимые показатели распространения микобактериозов, особенно после отмены вакцинации БЦЖ, предполагают наличие ложноположительных результатов туберкулиновой пробы. ■

(Продолжение статьи читайте в следующем номере «МВ»; список используемой литературы находится в редакции газеты)