
В.А. Серегина, А.М. Будрицкий, Н.С. Аляхнович, Е.С. Минина

УО «Витебский государственный медицинский университет», Витебск, Республика Беларусь

Value of the antitubercular antibody levels in pulmonary tuberculosis

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

Аннотация

В настоящее время отмечается рост заболеваемости туберкулезом и эпидемиологическая ситуация в мире продолжает оставаться напряженной. Каждый третий житель планеты инфицирован туберкулезными микобактериями. В новом тысячелетии число жертв от туберкулеза катастрофически выросло: ежегодно выявляют свыше 10 миллионов новых случаев заболевания и 3 миллионов смертей от него, в связи с чем, ВОЗ объявила туберкулез глобальной проблемой [1, 2]. Благодаря целенаправленной, систематической работе по про-

филактике, диагностике и лечению, эпидемиологическую ситуацию по туберкулезу в нашей республике можно характеризовать как стабильную и контролируруемую [3].

Одним из приоритетных направлений в борьбе с туберкулезом является своевременная и достоверная диагностика туберкулеза легких для предупреждения прогрессирования и распространения инфекции [4, 5]. Для диагностики туберкулеза легких используются клинические, микробиологические, лучевые, молекулярно-генетические, иммунологические методы [6]. Ключевая роль в возникновении туберкуле-

за и его дальнейшем течении отводится иммунореактивности [7, 8]. Туберкулиновая проба Манту является вариантом иммунологической диагностики туберкулеза, но ее диагностические возможности ограничены низкой специфичностью [9, 10]. Для дифференциальной диагностики поствакцинальной и постинфекционной аллергии в настоящее время предложен «Диаскинтест» [11]. Недавно появился метод диагностики латентного туберкулеза - QuantiFERON TB-2G, лишенный недостатков кожной пробы [5, 12, 13].

Бесспорно, важным является достоверное подтверждение диагноза при обнаружении микобактерий туберкулеза в организме пациента, что проводится с помощью бактериоскопии, посева на плотные питательные среды, системой «Bactec», ПЦР-диагностикой [6]. Несмотря на многообразие методов, в 20-30% случаев туберкулеза бактериовыделение не определяется, а через 1-2 недели на фоне лечения противотуберкулезными лекарственными средствами прекращается, что затрудняет дальнейший лабораторный контроль динамики специфического процесса. В этом случае оказываются полезными серологические иммунологические тесты [7, 8, 14]. Есть наблюдения, указывающие на значимость уровней антител классов G1, G3 и E в диагностике активного туберкулезного процесса, а также переключение уровня иммуноглобулина M на иммуноглобулины класса G к туберкулину при реактивации туберкулезного процесса [15]. Проводилась сравнительная оценка интерферонового теста, неоптрин и противотуберкулезных антител в клинико-лабораторной диагностике туберкулеза легких [16]. Полной ясности о роли противотуберкулезных антител при туберкулезе до сих пор нет. Однако надо полагать, что едва ли столь совершенная реакция как антителообразование запускается впустую. По последним данным авторов рекомендуемого метода определения уровня суммарных антител с помощью тест-системы «АТ-Туб-Бест» чувствительность в зависимости от формы заболевания составляет от 61% до 87% и выше, а специфичность анализа равна 95% [17]. Однако, сам по себе факт превышения порогового уровня суммарных антител у пациента не свидетельствует об активном туберкулезе. Исследование уровней противотуберкулиновых антител разных классов может быть значимым для диагноза туберкулеза.

Цель исследования: повышение эффективности диагностики туберкулеза легких на основании определения уровня противотуберкулиновых антител (ПТАТ) классов E, G, M, A у паци-

ентов с туберкулезом легких и здоровых лиц, инфицированных микобактериями туберкулеза.

Определяли уровни ПТАТ классов E, G, M, A у 10 здоровых лиц и у 40 пациентов с туберкулезом легких. Для выявления ПТАТ использовался метод твердофазного гетерогенного ИФА с разделением компонентов. Кровь забирали из вены в пробирку и получали сыворотку. Разведения сыворотки подбирали экспериментально на основании статистической обработки кривых титрования, значения активности антител которых попадали на средний участок кривой ($\alpha=95\%$, $p<0,05$), где измерение наиболее достоверно. Сыворотку разводили в 4 раза (для определения IgE-антител), в 50 раз (для определения IgM-антител), в 100 раз (для определения IgG-антител и IgA-антител) буферным физиологическим раствором (БФР) pH 7,2. Для постановки реакции ИФА использовали полистирольные планшеты с адсорбированным на них туберкулином, очищенным сухим производства «Санкт-Петербургский НИИ вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов». Для приготовления аллергена брали ампулу сухого туберкулина с концентрацией 50000 TE в 1мл и разводили в 20 мл бикарбонатного буфера (pH 9,4). Полученный раствор вносили по 150 мкл в каждую лунку планшета. Определение IgE, IgG, IgA, IgM-антител проводилось методом ИФА с помощью моноклональных анти-Ig-антител, меченых пероксидазой хрена, производства ООО «Полигност» г. Санкт-Петербург. В лунки планшет вносили по 100 мкл разведенных сывороток исследуемых лиц и инкубировали 60 мин при 37°C в термостате. В лунки контроля сыворотки не вносили. Содержимое лунок удаляли и отмывали 3 раза фосфатным буферным раствором (ФБР) (pH 7,2) с 0,05% содержанием твина. Время экспозиции промывающего раствора 4-5 мин. После промывки вносили анти-Ig-антитела, меченные пероксидазой хрена, по 100 мкл в каждую лунку стрипа и инкубировали 45 мин при 37°C в термостате. Из лунок удаляли конъюгат и отмывали 4 раза ФБР (pH 7,2) с 0,05% содержанием твина. Время экспозиции промывающего раствора 4-5 мин. Далее вносили проявляющий раствор, добавляя во все лунки планшеты по 150 мкл хромоген-субстратной смеси (0,015% H_2O_2 и ТМБ, разведенные фосфат-цитратным буфером с pH 5,0). Проявляющий раствор готовили непосредственно перед внесением. Инкубировали при

комнатной температуре в течение 15-25 мин до появления выраженного окрашивания синего цвета. Останавливали реакцию внесением 50 мкл 4% серной кислоты - цвет раствора изменялся на желтый. Оценку реакции проводили на фотометре (Anthos 2010 с программным обеспечением ADAP 1.6) при длине волны 450 нм/620 нм.

Реакцию считали положительной, если оптическая плотность опытной пробы превышала оптическую плотность пробы отрицательного контроля не менее чем вдвое и составляла более 0,590. При меньшем значении оптической плотности опытной пробы результат считался сомнительным (0,350-0,590) или отрицательным ($< 0,350$) (табл.1).

Полученные результаты обрабатывали при помощи пакетов программ MS Excel, Statistica 6.0 [18].

В исследовании приняли участие 50 человек, из них основную группу (ОГ) составили пациенты с туберкулезом легких, контрольную группу (КГ) - 10 здоровых добровольцев.

В ОГ наблюдались 7 женщин (17,5%) и 33 мужчины (82,5%). Из них городские жители - 23 человека (57,5%), сельские - 17 человек (42,5%); работающих и безработных, а также проживающих в семье и одиноких оказалось поровну - по 20 человек (50%). В удовлетворительных бытовых условиях проживали 27 человек (67,5%), в неудовлетворительных - 13 человек (32,5%). Из пациентов ОГ 33 человека курили (82,5%), 34 человека (85%) употребляли алкоголь.

При анализе клинических форм туберкулеза легких выявлено преобладание инфильтративного туберкулеза - 30 (75%) человек. Очаговый туберкулез выявлен у 3 (7,5%), фиброзно-кавернозный - у 1 (2,5%), туберкулез внутригрудных лимфатических узлов - у 1 (2,5%), диссеминированный туберкулез - у 2 (5%), туберкулезный плеврит - у 1 (2,5%), туберкулема - у 2 (5%) человек. У 31 (77,5%) пациента туберкулез был выявлен впервые, у 9 (22,5%) пациентов констатирован рецидив процесса. Первый рецидив выявлен у 6 чело-

век (15,0%), второй - у 1 человека (2,5%), третий - у 2 человек (5,0%). Среди пациентов с впервые выявленным туберкулезом легких инфильтративная форма выявлена у 25 (80,6%) человек, среди пациентов с рецидивом - у 5 (56%) человек.

Проба Манту с 2 ТЕ ППДЛ была отрицательной у 2 пациентов (5,0%), сомнительной у 2 (5,0%), положительной - у 33 (82,5%), гиперергической - у 3 пациентов (7,5%). Сопутствующую патологию имели 25 (62,5%) пациентов. Изменения в лейкоцитарной формуле выявлены у 30 (75%) пациентов.

Средний возраст лиц исследуемой группы составил 41 год (минимальный - 24 года, максимальный - 75 лет, стандартное отклонение 12). Среднее значение индекса массы тела составило 22,0 кг/м² (минимальное - 16,7, максимальное - 32,4, стандартное отклонение 3,4). Параметр «возраст», как и индекс массы тела (количественные переменные) подчинялись нормальному закону частотного распределения. Остальные показатели (пол, место проживания, бытовые условия, социальное положение, трудовая занятость, наличие вредных привычек, показатели пробы Манту с 2 ТЕ ППД-Л, наличие и количество рецидивов, клиническая форма туберкулеза, наличие сопутствующих заболеваний, изменения в гемограмме) - порядковые и при их сравнении использовались непараметрические методы статистического анализа.

Проведен анализ ранговой корреляционной зависимости Спирмена: выявлена умеренная прямая достоверная зависимость между мужским полом и курением (0,64); бытовыми условиями и положительной пробой Манту (0,49); курением и алкогольной зависимостью (0,72).

Уровни ПТАТ разных классов достоверно не отличались у лиц ОГ с разными клиническими формами туберкулеза. У лиц ОГ, проживающих в неудовлетворительных бытовых условиях, уровень IgA-антител был выше, чем у лиц с удовлетворительными условиями быта (тест Манна-Уитни, $p=0,049$). Это может свидетельствовать о большей стимуляции гуморального

Таблица 1. Шифр полученных результатов

0 (-) отрицательная проба	$< 0,350$ - neg
1 (+-) сомнительная проба	0,350-0,590 - somn
2 (+) слабо положительная проба	0,590-0,900 - pos+
3 (++) умеренно положительная проба	0,900-1,200 - pos ++
4 (+++) выражено положительная проба	$> 1,200$ - pos +++

звена иммунитета у лиц, проживающих в неудовлетворительных бытовых условиях (рис.1).

Уровень IgA-антител к туберкулину был ниже у лиц с положительной пробой Манту (тест Kruskal-Wallis, $p = 0,03$; медианный тест Chi-Square, $p = 0,004$). Это наблюдение может свидетельствовать о снижении гуморального звена иммунитета, в том числе защитных IgA-антител и, возможно, преобладании клеточного звена иммунитета у лиц с положительной пробой Манту (рис.2).

У лиц ОГ определялись ПТАТ всех субклассов, причем в соответствии с единицами оптической плотности умеренно и выражено положительными пробами были представлены только антитела класса IgE (50% от общего количе-

ства IgE) и антитела класса IgG (5% от общего количества IgG).

У лиц КГ в диагностически значимом титре определялись лишь ПТАТ классов IgG, IgA, IgM, причем в соответствии с единицами оптической плотности умеренно и выражено положительными пробами были представлены только антитела класса IgA (10% от общего количества IgA) и антитела класса IgM (20% от общего количества IgM).

У лиц ОГ и КГ выявлены достоверные различия уровней ПТАТ (Тест U Манна-Уитни) класса IgE ($p=0,0003$), IgA($p=0,0002$), IgM($p=0,001$), причем уровни антител IgE были выше у лиц ОГ, а уровни антител классов IgA, IgM выше у пациентов КГ.

Достоверных различий уровней ПТАТ класса IgG у пациентов ОГ и КГ не выявлено.

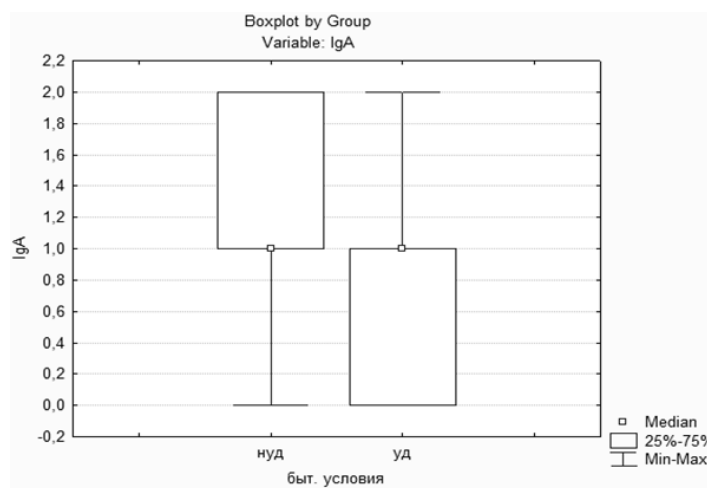


Рис. 1. Увеличение уровня IgA-антител в асоциальной группе пациентов с туберкулезом легких

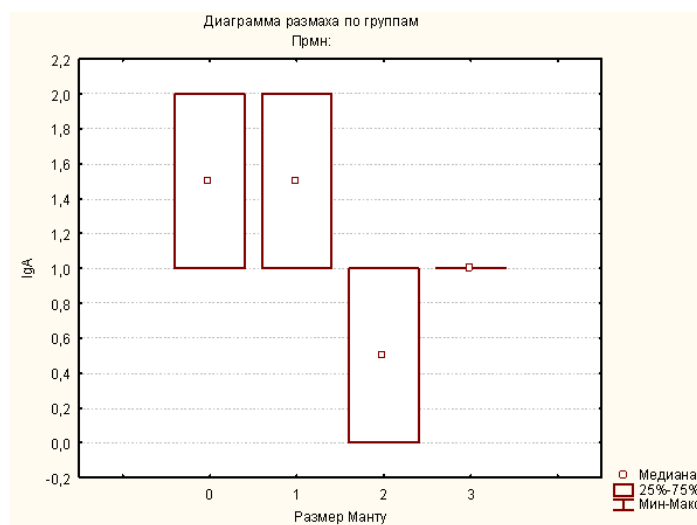


Рис. 2. Уровень IgA-антител в зависимости от размеров пробы Манту

1. Наличие IgE-антител к туберкулину в диагностически значимом титре является значимым критерием подтверждения диагноза активного туберкулеза.
 2. Низкие уровни IgA-, IgM-антител к туберкулину могут указывать на угнетение гуморального иммунного ответа при выраженной активности туберкулезного процесса.
 3. Высокие уровни IgA-, IgM-антител к туберкулину у здоровых инфицированных лиц, вероятно, являются проявлением нестерильного гуморального иммунитета к микобактерии туберкулеза.
-
1. Edine W. Tiemersma, Marieke J. van der Werf, Martien W. Borgdorff, et al. Natural History of Tuberculosis: Duration and Fatality of Untreated Pulmonary Tuberculosis in HIV Negative Patients: A Systematic Review. Published online Apr 4, 2011. doi: 10.1371/journal.pone.0017601.
 2. Kranzer K, Houben R, Judith R G et al. Yield of HIV-associated tuberculosis during intensified case finding in resource-limited settings: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* Feb 2010; 10(2): 93–102.
 3. Гуревич Л.Г., Скрыгина Е.М., Залуцкая О.М. Диагностика и дифференциальная диагностика туберкулеза легких на различных уровнях оказания медицинской помощи. *Туберкулез и болезни легких.* 20014; 1: 16–19.
 4. Лабораторная диагностика туберкулеза (опыт работы Московского научно-практического центра борьбы с туберкулезом Комитета здравоохранения г. Москвы). Под ред. В.И. Литвинова, А.М. Морозова. М.; 2001, 175 с.
 5. Payam Nahid, Peter S. Kim, Carlton A. Evans et al. Clinical Research and Development of Tuberculosis Diagnostics: Moving From Silos to Synergy. *J Infect Dis.* 2012; 205; 2: 159–168.
 6. Гольшевская В. И., Севастьянова Э.В., Иртуганова О.А [и др.]. Современное состояние лабораторной службы России по диагностике туберкулеза: основные проблемы и пути их. *Пробл. туб.* 2006; 12: 36–48.
 7. Яковлева Л. Ф., Лысенко А. П., Агеева Т. Н. Иммунный спектр сыворотки крови при различных формах туберкулеза и его влияние на результативность серологической диагностики. *Имунопатология, аллергология, инфектология* 2004; №2: 129–132.
 8. Воронкова О.В., Уразова О.И., Новицкий В.В. [и др.]. *Имунопатология туберкулеза лёгких.* Томск: Изд-во ТГУ; 2007.
 9. Бородулин Б. Е., Бородулина Е.А., Амосова Е.А. Сравнительная оценка кожных туберкулиновых проб. *Туберкулез и болезни легких.* 2010; 8: 18–22.
 10. Yang H, Kruh-Garcia N.A, and Dobos K.M. Purified protein derivatives of tuberculin – past, present, and future. *FEMS Immunol Med Microbiol.* Dec 2012; 66(3): 273–280.
 11. Кожная проба с препаратом «Диаскинтест» - новые возможности идентификации туберкулезной инфекции. Под ред. М.А. Пальцеева. М.: ОАО «Издательство «Медицина»; 2010, 176 с.
 12. Попов С.А., Сабгайда В.А., Пузанов В.А. Пути оптимизации лабораторной диагностики туберкулеза. *Справочник заведующего КДЛ.* 2007; 12: 17–28.
 13. Pail M., Dendukuri N., Wang L., et al. Improving the estimation of tuberculosis infection prevalence using T-cell-based assay and mixture models. *Int J Tuberc Lung Dis.* Aug 2008; 12(8): 895–902.
 14. Новицкий В.В., Стрелис А.К., Серебрякова В.А. [и др.]. Иммунный статус больных инфильтративным лекарственно-устойчивым туберкулезом на фоне противотуберкулезной химиотерапии. *Имунология.* 2007. Т. 28, №1. С. 27–30.
 15. Hussain R, Dawood G, Abrar N. Selective increases in antibody isotypes and immunoglobulin G subclass responses to secreted antigens in tuberculosis patients and healthy household contacts of the patients. *Clin Diagn Lab Immunol.* Nov 1995; 2(6): 726–732.
 16. Васильева Е.В., Лапин С.В., Блинова Т.В. [и др.]. Сравнительная оценка квантиферонового теста, неоптрина и специфических противотуберкулезных антител для клинико-лабораторной диагностики туберкулеза легких. *Клиническая лабораторная диагностика.* М. 2013; 4: 24–27.
 17. Гладкова С.Е., Решетников С.С., Пряхина В.Н. Опыт применения тест-системы «АТ-Туб-Бест» для диагностики туберкулеза. *Медицина и здоровье* 2011; №5, (61): 22–25.
 18. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistic. М.: МедиаСфера, 2002, 312 с.

Сведения об авторах:

Серегина Валентина Александровна, старший преподаватель кафедры фтизиопульмонологии УО «ВГМУ», 210023, г. Витебск, пр-т Фрунзе, 27, Е - mail: valentina-seregina@mail.ru

Будрицкий Александр Михайлович, к.м.н., доцент, заведующий кафедрой фтизиопульмонологии УО «ВГМУ», 210023, г. Витебск, пр-т Фрунзе, 27, Е - mail: alexandrbdri@rambler.ru

Аляхнович Наталья Сергеевна, ассистент кафедры клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК УО «ВГМУ», 210023, г. Витебск, пр-т Фрунзе, 27, Е-mail: all-vgmu@mail.ru.

Минина Елена Сергеевна, аспирант кафедры клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК УО «ВГМУ», 210023, г. Витебск, пр-т Фрунзе, 27, Е-mail: lena89-05@mail.ru.

Поступила 23.04.2014 г.