**Введение.**

Туберкулез известен с глубокой древности. Однако, несмотря на повсеместно проводимую работу по борьбе с туберкулезом и совершенствование методов его диагностики и лечения, эпидемическая ситуация по туберкулезу остается весьма напряженной [1, 2].

Согласно оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в 2015 г. туберкулезом заболело 10,4 млн. человек, в т.ч. 5,9 млн. (56,0%) мужчин, 3,5 млн. (34,0%) женщин и 1,0 млн. (10,0%) детей. Более половины новых случаев (60,0%) заболевания приходится на шесть стран: Индию, Индонезию, Китай, Нигерию, Пакистан и Южную Африку [3]. С 2014 по 2015 годы темпы снижения заболеваемости ТБ составили во всем мире лишь 1,5%. В 2015 г. от туберкулеза умерло около 1,4 млн. человек. Отмечено, что в период с 2000 по 2015 гг. численность умерших от ТБ сократилась на 22,0%, однако и до настоящего времени во всем мире туберкулезная инфекция остается одной из 10 ведущих причин смерти людей [4].

Осуществлять контроль за распространением туберкулезной инфекции без раннего выявления заболевания не представляется возможным [5, 6, 7].

Латентная, или скрытая, туберкулезная инфекция является закономерным этапом развития инфекционного процесса в организме, который сопровождается персистированием *M.tuberculosis* в организме и характеризуется длительным бессимптомным пребыванием возбудителя с сохранением его патогенетических свойств, способности к размножению и реверсии, о чем писали Dienes L. и Parish N.M. еще в середине и конце XX века.

В последние годы к диагностике латентной туберкулезной инфекции (ЛТИ) приковано особое внимание, в том числе благодаря внедрению различных иммунологических методов определения активности туберкулезной инфекции [7, 8].

Революцией в разработке новых методов иммунологической диагностики стала расшифровка генома микобактерий туберкулеза, в котором закодировано более 4000 белков. Была выделена группа белков, экспрессирующихся при размножении микобактерий, кодируемых в зоне RDI (region of difference), названных ESAT-6 и CFP-10, что позволило разработать новые высокоинформативные иммунологические тесты in vitro (IGRA–тесты: QuantiFERON (QFT)**-**TB, T-SPOT.*TB* тест, IP-10) и in vivo (с туберкулином, с аллергеном туберкулезным рекомбинантным (проба с Диаскинтестом**®**)) [9, 10].

 По мнению ряда авторов, лабораторные тесты QuantiFERON-TB Gold/ QuantiFERON-TB Gold In-Tube и ELISPOT/T-SPOT.TB должны дополнять туберкулинодиагностику, в первую очередь, для идентификации ложноотрицательных результатов выявления латентной туберкулезной инфекции, активного туберкулеза и новых случаев туберкулеза у больных при проведении терапии ингибиторами ФНО-α, особенно в странах с умеренной и высокой распространенностью туберкулеза, а также могут служить полезными инструментами для скрининга и мониторинга латентной туберкулезной инфекции в комбинации с внутрикожной туберкулиновой пробой Манту с 2 ТЕ [11, 12, 13]

 В России на основе белков, кодируемых в зоне RDI, в 2006 году был разработан новый диагностический препарат Диаскинтест®, который представляет собой рекомбинантный белок CFP-10-ESAT-6, продуцируемый *Escherichia coli*. Основным механизмом действия теста также является формирование реакции гиперчувствительности замедленного типа. При этом белок CFP-10-ESAT-6 не обладает сенсибилизирующей активностью и не токсичен. Высокая диагностическая ценность пробы с Диаскинтестом (ДСТ) подтверждается во многих российских исследованиях [10, 14, 15, 16].

Однако применение данных иммунологических методов не позволило проводить дифференциальную диагностику между латентной туберкулезной инфекцией и активным туберкулезом, так как тесты показывают положительный результат в обоих случаях [6, 17, 18].

Поиск новых диагностических критериев для определения активности туберкулезной инфекции является приоритетной задачей при определении группы высокого риска развития туберкулеза.

Цель исследования – повышение ранней диагностики туберкулеза с помощью определения новых иммунологических критериев активности туберкулезной инфекции.

**Материал и методы.**

Проспективное исследование было проведено за период с декабря 2016 года по июль 2017 года с включением 135 больных туберкулезом легких (I группа), которые проходили лечение на базе ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава РФ, 28 лиц с латентной туберкулезной инфекцией (ЛТИ) (II группа) и 24 человека (здоровых лиц) - группа контроля (III группа). Исследование было одобрено независимым этическим комитетом ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России (выписка из протокола №34.2 от 19.01.2017) и ФГБОУ ВО СПбГУ (выписка из протокола №02-126 от 30.07.2017), все участники исследования подписали информированное согласие.

Диагноз «туберкулез легких» устанавливался при наличии клинических проявлений, характерных рентгенологических изменений; положительных результатов обследования на туберкулёз (выявление в анализах мокроты *M.tuberculosis* (MBT) и / или MTB ДНК по данным молекулярно-генетических и бактериологических методов), гистологической верификации изменений в легких (выявление эпителиоидно-клеточных гранулем с участками казеозного некроза и кислотоустойчивых бактерий).

Критериями включения являлись: возраст от 18 до 65 лет; у больных туберкулезом - наличие бактериовыделения по данным лабораторного обследования; у лиц с ЛТИ - наличие положительного результата иммунологического теста при отсутствии клинических и рентгенологических данных об активном туберкулезе.

Критериями исключения являлись: анамнестические данные о применении иммуносупрессивной терапии, лечение противотуберкулезными препаратами более одного месяца, наличие ВИЧ-инфекции, сифилиса, опухолевых заболеваний, сахарного диабета, а также выявление других гранулематозных заболеваний легких.

Критериями включения для группы здоровых лиц являлись: отсутствие острых и хронических заболеваний, отсутствие риска развития туберкулеза и отрицательные результаты иммунологических тестов.

**Методы исследования.**

 Все пациенты прошли комплекс обследования, включавший клиническую оценку заболевания, мультиспиральную компьютерную томографию (МСКТ) органов грудной клетки, лабораторные исследования крови, стандартный комплекс обследования на туберкулез.

После комплексного обследования проводился забор крови для проведения QuantiFERON TB Gold (QFT) и ELISPOT, далее - постановка пробы Манту с 2ТЕ (ПМ/TST) и пробы с аллергеном туберкулезным рекомбинантным (АТР/Диаскинтест /DST). За 5-тилетний период наблюдения тесты на высвобождение интерферона-γ (IGRA-тесты) из-за ограниченных возможностей были выполнены только у части обследованных. Оценка результатов иммунологических проб осуществлялась с учетом полученной выборки по каждому тесту.

Постановка пробы с аллергеном туберкулезным рекомбинантным (DST) аналогична пробе с туберкулином. Инъекция проводится внутрикожно, считывание результата осуществляется через 72 часа путем измерения диаметра папулы в месте инъекции.

Согласно инструкции при наличии папулы любого размера результаты DST интерпретировались как положительные. Наличие гиперемии при отсутствии папулы - расценивались как сомнительная проба. В настоящем исследовании для объективной оценки наличия папулы определен cut off ≥ 5 мм.

TST в рамках российского законодательства осуществлялся с применением туберкулина ППД-Л с 2 туберкулиновыми единицами (Россия, АО «Фармстандарт»). Результаты TST оценивались следующим образом: положительный - папула 5 и более мм, сомнительный - папула до 4 мм включительно или гиперемия любого размера. Отсутствие папулы и гиперемии при обоих тестах являлось отрицательным результатом.

Тест T-SPOT®.TB был выполнен в соответствии с инструкцией изготовителя (Оксфорд Иммунотек, Великобритания). Очищенные лимфоциты периферической крови инкубировали с антигенами теста с использованием культуральной среды GIBCO AIM-V ™ (Invitrogen, Paisley, UK). Количество пятен в каждой лунке (представляющих клетки, секретирующие IFN-γ) оценивалось визуально при помощи увеличительного стекла двумя независимыми наблюдателями, которые не знали результатов QFT. Результаты были интерпретированы в соответствии с критериями, определенными изготовителем для использования теста за пределами США. Положительный результат был определен как ≥ 6 пятен либо в лунке ESAT-6, либо в лунке CFP-10 после вычитания количества пятен, обнаруженных в отрицательной контрольной лунке, где отрицательный контроль имеет 0-5 пятен. Если отрицательная контрольная часть имела ≥ 6 пятен, панель ESAT-6 или CFP-10 для положительного результата должна была содержать по крайней мере вдвое больше пятен, обнаруженных на отрицательной панели. Результат был неопределенным, если в отрицательной контрольной лунке было более 10 пятен или менее 20 - в контроле митогена (с <6 в лунках ESAT-6 и CFP-10).

Тест QuantiFERON-TB Gold (QFT) также был выполнен в соответствии с инструкцией изготовителя (Селлестис Лимитед, Австралия). Венозную кровь собирали у каждого пациента из трех специальных эвакуированных и гепаринизированных пробирок крови, откалиброванных для натягивания 1 мл крови. Набор включал трубку, покрытую TB-Antigen, трубку NIL (отрицательный контроль) и митогенную (фитогемагглютининовую) трубку в качестве положительного контроля. Как рекомендовано, значение отсечки для положительного теста было IFN-γ> 0,35 МЕ/мл, для TB-Antigen - минус NIL. Отрицательный результат был зарегистрирован, если этот ответ составлял <0,35 МЕ/мл, а контроль митогена - минус NIL- ≥ 0,5 МЕ/мл. Если уровень IFN-γ как для TB-Antigen-NIL, так и для mitogen-NIL был меньше, чем их соответствующие отсечки, результат интерпретировался как неопределенный. Максимальный уровень IFN-γ, точно определяемый с помощью ИФА с QFT, составляет 10 МЕ/мл, и, таким образом, превышающие значения, сообщаются как 10 МЕ/мл.

Результаты IGRA-тестов пограничной линии были классифицированы как отрицательные из-за неопределенной вероятности заражения ТБ.

Плазма всех включенных пациентов была исследована в ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова» с определением образующихся *in vitro* иммунных комплексов (ИК) методом динамического светорассеяния (ДСР) по предложенной методике (заявка на патент № 2015149694; дата публикации 24 мая 2017 г., Филатов М.В., Ланда С.Б.). Измерения проводились на лазерном корреляционном спектрометре (сертификат RU. C. 39.003. А № 5381) ЛКС-03 (ИНТОКС-МЕД, Россия) [19, 20].

Метод ДСР позволяет определить входящие в состав ИК компоненты без выделения комплексов из плазмы и определить крупные частицы, которыми являются ИК. Кроме того, метод позволяет работать с нативными образцами в физиологических условиях и имеет узкий круг необходимых преаналитических процедур: разбавление, центрифугирование, фильтрование [21].

Полученная от пациентов плазма крови разбавляется в 4 раза фосфатным буфером, содержащим 10 мМ концентрацию этилендиамин-тетрауксусной кислоты, подвергается центрифугированию в течение 15 минут при 15 тысячах оборотов в минуту и фильтрации через фильтр с размерами пор 100 нм для удаления всех частиц и белковых агрегатов, превышающих данный размер. Измерение ДСР полученного препарата должно показывать отсутствие каких-либо образований, превышающих по размеру 100 нм.

В полученные образцы плазмы объемом 400 мкл добавляют 10 мкл приготовленного антигена. В качестве специфического туберкулезного антигена применялись ESAT-6/SFP-10 (Генериум, Россия).

Для статистического анализа данных были использованы методы, доступные в программе Stata 14 (StataCorp, США) [22]. При обработке результатов также методы описательной статистики, характеризующей субъекты, включенные в исследование. Для количественных параметров оценивались арифметическое среднее (Mean); стандартное отклонение (SD); 95 % доверительный интервал (ДИ) для среднего. Для качественных переменных анализировалось абсолютное количество в формате n/N, а также доля (%). Для сравнения чувствительности различных тестов в каждой из групп был использован Q-критерий Кохрена. Для всех тестов было проведено попарное сравнение с результатами кожной пробы с Диаскинтестом при величине cut-off ≥5 мм. Для целей проведения анализа отрицательные, сомнительные и неинтерпретируемые результаты были объединены в одну группу. Для каждой пары тестов был рассчитан коэффициент согласованности каппа, который учитывает возможность случайного совпадения результатов. Сравнение частоты наличия признака между подгруппами пациентов проводилось с помощью точного теста Фишера. Различия в сравниваемых группах считали достоверными при уровне статистических различий р<0,05.

Также оценивались показатели диагностической значимости методов: диагностическая чувствительность (ДЧ); диагностическая специфичность (ДС); диагностическая эффективность (ДЭ). Расчет показателя отношения шансов (odds ratio, OR) производился по формуле (a/c)/(b/d)=(a·d)/(b·c) (a – истинно положительный и b – ложноположительный результат; c – ложноотрицательный и d – истинно отрицательный результат). Значимой считалась величина относительного риска более 1.0.

**Результаты обследования пациентов.**

Положительные результаты обследования по данным клинических, рентгенологических и бактериологических методов у больных туберкулезом (I группа) представлены в таблице 1.

*Таблица 1.* ***Результаты комплексного обследования с применением различных методов у больных туберкулезом***

Представленные в таблице 1 данные демонстрируют возможность получения положительного результата по данным методов, на основании которых осуществлялась диагностика туберкулеза. У всех больных определялось только наличие рентгенологических изменений, при этом клиническая симптоматика могла определяться в 70% случаев, а бактериологическое подтверждение диагноза было получено только в 45,2% случаев.

Применение иммунологических методов может улучшить диагностику туберкулеза в условиях отсутствия бактериовыделения. С целью анализа результатов тестов группа больных туберкулезом легких была разделена на две подгруппы Ia и Ib, с бактериовыделением и без бактериовыделения соответственно. Положительные результаты иммунологических тестов в подгруппах представлены в таблице 2.

***Таблица 2. Результаты различных диагностических тестов у больных туберкулезом***

Как представлено в таблице 2, получение положительных результатов с применением иммунологических тестов у больных туберкулезом варьируется от 84,9% до 90,6% в Ia и от 69,4% до 83,6% - в Ib подгруппе в зависимости от применения тестов.

Таким образом, проведенный комплекс обследования наглядно демонстрирует отсутствие возможности верификации диагноза туберкулеза легких в половине случаев, при этом при наличии соответствующих рентгенологических изменений клиническая симптоматика регистрируется в 60% случаев.

 Регистрация латентной туберкулезной инфекции возможна только при наличии положительного иммунологического теста. В данном исследовании учитывались только результаты новых иммунологических тестов (T-SPOT, QTF и DST) при отсутствии клинических и рентгенологических проявлений активного туберкулеза. Очевидно, что у лиц с ЛТИ в 100% случаев имеет место положительный иммунологический тест, тогда как положительный тест у больных туберкулезом был в 69,4% и 90,6% случаев в зависимости от диагностических возможностей применяемого теста. Полученные данные демонстрируют отсутствие возможности подтвердить туберкулез на основании бактериологических методов и различить ЛТИ и активный туберкулез при отсутствии различий по результатам существующих иммунологических методов, что требует разработки новых критериев определения активности туберкулезной инфекции на основании именно иммунологических методов, которые позволяют без выявления возбудителя констатировать иммунный ответ на наличие микобактерий туберкулёза в организме человека.

Далее был проведен анализ уровня иммуноглобулинов, которые определялись в трех группах наблюдения с помощью метода динамического светорассеяния. При этом определение иммуноглобулинов осуществлялось у больных туберкулезом с верифицированным диагнозом (Ia подгруппа).

Результаты определения уровня специфических ИК в плазме крови в группах сравнения (Iа и II), а также в группе контроля (III) представлены в таблице 3.

***Таблица 3 Определение иммунных комплексов в крови после добавления антигенного материала ESAT-6/SFP-10 в группах***

Согласно представленным в таблице 3 данным, суммарные ИК определялись во всех группах в одинаковом проценте случаев, но во II и III группах они регистрировались на достоверно низком уровне, так же как IgG1. Следует отметить, что во II и III группах в единичных случаях определялись IgG3 и IgЕ, также как изотипы IgG1+IgG3, IgG1+IgE и IgG3+IgE.

На основании полученных данных был проведен расчет показателей диагностической значимости метода, которые представлены в таблице 4.

***Таблица 4. Показатели диагностической значимости определения специфических иммунных комплексов***

Как представлено в таблице 4, определение общих ИК, стимулированных специфическим антигеном, не имеет высокой диагностической значимости при определении туберкулёзной инфекции, но изотипы иммуноглобулинов демонстрируют высокую специфичность и чувствительность.

Определение низкого уровня иммунных комплексов в условиях высокого уровня распространения туберкулезной инфекции является допустимым и может свидетельствовать о наличии слабых проявлений латентной туберкулезной инфекции, а также подтверждает высокую чувствительность метода. Однако не является понятным отсутствие высокого уровня ИК у лиц с латентной туберкулезной инфекцией. При этом полученные результаты позволяют выявлять группу высокого риска по развитию активного туберкулеза среди лиц с латентной туберкулезной инфекцией.

**Обсуждение и заключение**

Известно, что, несмотря на значительную долю инфицированных микобактерией туберкулёза (МБТ) людей, составляющую примерно одну треть населения земного шара, только в 5-10% случаев происходит развитие туберкулёза в той или иной клинической форме. У остальных инфекция носит латентный, бессимптомный характер. В результате взаимодействия звеньев врождённого и адаптивного иммунитета в большинстве случаев происходит либо полное освобождение от инфекции, либо подавление её активности и перевод в латентную форму. В отдельных случаях возможны нарушения в этой цепи взаимодействий, что приводит к развитию инфекции не только в лёгких, но и распространение МБТ с кровью в различные ткани организма. Уже доказано, что лица, которые имеют положительные иммунологические тесты, определяющие латентную туберкулезную инфекцию, являются группой высокого риска по развитию активной туберкулезной инфекции. Однако результаты проведенных до настоящего времени исследований не продемонстрировали достоверно значимых иммунологических различий между этими состояниями [13].

Определение специфических иммунных комплексов позволило наиболее точно из всех существующих сегодня иммунологических методов в 100% случаев определить активность туберкулезной инфекции у больных туберкулезом, а также выявить достоверную разницу между активной и латентной туберкулезной инфекцией. В исследовании удалось получить данные, которые позволяют выявить группу особого риска в развитии активного туберкулеза среди лиц с положительными иммунологическими тестами. Низкий уровень изотипов специфических иммуноглобулинов у лиц с ЛТИ позволяет говорить о благоприятном прогнозе в отношении развития активного туберкулеза, и, наоборот, нарастание в динамике уровня изотипов IgG3 и IgE может свидетельствовать о неблагоприятной тенденции в отношении развития туберкулезной инфекции. В настоящее время такой прогноз невозможно осуществить с применением используемых в клинической практике иммунологических тестов.