

На правах рукописи

ПЛЕХАНОВА МАРИЯ АЛЕКСАНДРОВНА

**ПЕРСОНИФИЦИРОВАННАЯ РАННЯЯ ДИАГНОСТИКА И СТРАТИФИКАЦИЯ
РИСКОВ ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ**

14.01.08 – педиатрия

14.01.16 – фтизиатрия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Москва – 2019

Работа выполнена в ФГБОУ ВО Омский государственный медицинский университет Минздрава России

Научные консультанты:

доктор медицинских наук, профессор

Кривцова Людмила Алексеевна

доктор медицинских наук, профессор

Аксенова Валентина Александровна

Официальные оппоненты:

Блохин Борис Моисеевич – доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, кафедра поликлинической и неотложной педиатрии, заведующий кафедрой

Ильенкова Наталья Анатольевна – доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, кафедра детских болезней с курсом ПО, заведующий кафедрой

Чугаев Юрий Петрович – доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, кафедра фтизиатрии и пульмонологии, профессор кафедры

Ведущая организация:

ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России

Защита состоится «___» _____ 2019 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д.208.040.10 на базе ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8 стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, Москва, Зубовский бульвар, д.37/1 и на сайте <http://sechenov.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

кандидат медицинских наук, доцент

Чебышева Светлана Николаевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Латентная туберкулезная инфекция (ЛТИ) определяется как состояние стойкого иммунного ответа на попавшие ранее в организм антигены микобактерий туберкулеза (*M. tuberculosis*) (МБТ) при отсутствии клинических проявлений активной формы туберкулеза (ТБ) [WHO, 2015]. По оценкам экспертов ВОЗ, около одной четверти населения мира имеют латентный ТБ, в том числе и дети [WHO, 2016]. Риск того, что инфицированные МБТ, на протяжении своей жизни заболеют ТБ, составляет 5–15%, причем у части болезнь может развиваться в течение первых пяти лет с момента первичного инфицирования [WHO, 2016], которое преимущественно регистрируется в детском возрасте. При этом ТБ по-прежнему входит в число инфекционных болезней, уносящих наибольшее число жизней, так как остаются серьезные пробелы в лечении и профилактике [Floyd et al., 2018; N. Gupta et al., 2018]. Согласно оценкам, число заболевших ТБ в мире за 2016 г. составило 10,4 млн. человек (из них 6,9% случаев зарегистрировано среди детей), а 1,7 млн. человек умерли от этой болезни, в том числе около 250 000 детей [WHO, 2017; Floyd et al., 2018].

По заключению экспертов ВОЗ, базовыми элементами «Глобальной стратегии борьбы с ТБ после 2015 года» являются мероприятия, ориентированные на пациента (парадигма персонифицированной медицины). В первую очередь это вакцинация против ТБ и ранняя диагностика ТБ, систематический скрининг лиц, находившихся в контакте, и групп повышенного риска, а также профилактическое лечение подвергающихся повышенному риску [ВОЗ, 2015]. Существующая новая парадигма направлена на профилактику, при этом обращается внимание на наличие резервуара ЛТИ, что важно для снижения заболеваемости ТБ, а в сочетании с лечением всех случаев ТБ должно привести к ликвидации ТБ к 2050 г. [L. M. Kawamura, 2018]. При этом факторы, способствующие прогрессированию от ЛТИ до ТБ, в настоящее время полностью не изучены [I. Latorre et al., 2015], а существующие методы выявления и диагностики туберкулезной инфекции у детей не позволяют дифференцировать латентную от активной [P. Auguste et al., 2017; D. Goletti et al., 2018; WHO, 2018].

В настоящее время идет активный поиск инструментов (биомаркеров ЛТИ) для ранней диагностики и прогнозирования развития активной туберкулезной инфекции

[H. Su et al., 2017; D. Goletti et al., 2018]. При этом в условиях перехода к персонифицированной медицине исследования должны учитывать и молекулярно-генетические маркеры, влияющие на развитие и прогрессирование ТБ [Б. А. Кобринский, 2017].

Анализ протеома *M. tuberculosis* [P. R. Jungblut et al., 1999] позволил выявить не менее 1800 клеточных и 800 секретируемых белков, перспективных для создания новых вакцин и диагностических тестов [R. L. V. Skjot, 2000]. Однако идентификация таких потенциальных антигенов представляет собой непростую задачу, поскольку, с одной стороны, все еще отсутствуют точные данные о полном спектре секретируемых белков, выделяемых МБТ в организме больного, а, с другой стороны, известно, что их количественный и качественный составы могут существенно изменяться в зависимости от реакции организма при инфицировании МБТ и от течения заболевания [S. Y. Laal et al., 2005]. Данная проблема обусловлена еще тем, что до конца не раскрыты механизмы прогрессирования туберкулезной инфекции [J. M. Cliff et al., 2015]. Считается, что в защите от ТБ немаловажная роль принадлежит генетическим факторам, в том числе регулирующим иммунные механизмы [K. B. Majorov et al., 2005; L. M. Delbridge, 2007]. Например, установлено, что лица с генетическими дефектами в рецепторе интерферона-гамма (ИФН- γ) имеют повышенную восприимчивость к МБТ [M. J. Newport et al., 1996]. Большое внимание уделяется изучению роли полиморфизмов различных генов, в том числе гена ИФН- γ (*IFNG*), в развитии ТБ [Д. С. Ожегова, 2009; Е. Л. Никулина 2011; А. Л. Поспелов, 2011], но до настоящего времени не было исследований, позволяющих установить связь полиморфизма гена с уровнем специфического иммунного ответа на разных стадиях развития туберкулезной инфекции у детей.

В этой связи изучение механизмов прогрессирования туберкулезной инфекции у детей значимо. Выделение основных факторов прогрессирования, включая клинические, иммунологические и молекулярно-генетические, с их комплексной оценкой позволит разработать высокоэффективный алгоритм диагностики туберкулезной инфекции у детей, ориентированный на пациента.

Степень разработанности темы

Учитывая актуальность проблемы дифференциальной диагностики латентной и активной туберкулезной инфекции у детей для оптимизации ее профилактики [H. Su et

al., 2017; D. Goletti et al., 2018], отсутствие эффективных инструментов, в том числе «золотого стандарта» для ее ранней диагностики и прогнозирования у детей [P. Auguste et al., 2017; WHO, 2018], наличие ограниченных данных по факторам прогрессирования туберкулезной инфекции у детей, включая генетические, несмотря на их большое практическое значение [J. ElBaghdadi et al., 2013; J. M. Cliff, 2015], а также трудности, связанные с идентификацией специфических антигенов в зависимости от стадии туберкулезной инфекции для их использования в диагностических тестах у детей [2015; H. Su et al., 2017; D. Goletti et al., 2018], определяют недостаточную разработанность выбранной темы, делая ее областью интереса педиатрии и фтизиатрии.

Цель исследования: разработка и обоснование персонифицированной системы ранней диагностики и прогнозирования течения туберкулезной инфекции на основании клинических, современных иммунологических и молекулярно-генетических данных для ее профилактики у детей.

Задачи исследования

1. Провести анализ медико-биологических и социальных факторов, определяющих риск развития ЛТИ и ТБ у детей.
2. Оценить клинические факторы прогрессирования туберкулезной инфекции (от латентной к активной) у детей.
3. Определить иммунный статус детей с ЛТИ и больных ТБ.
4. Изучить распределение частот аллелей и генотипов полиморфизмов генов *IFNG* (T-1488C) и *MCP1* (C-2508T), а также их связь с прогрессированием туберкулезной инфекции у детей.
5. Выявить ассоциацию полиморфизма гена *IFNG* (T-1488C) с уровнем продукции специфического ИФН- γ при прогрессировании туберкулезной инфекции у детей.
6. Определить значимость специфических белков (ESAT6-CFP10, ESAT6, 85a, CFP32B, Rv2660c) при развитии туберкулезной инфекции у детей.
7. Установить информативность показателей уровня индуцированного ИФН- γ специфическими белками (ППД-Л, ESAT6-CFP10, ESAT6, 85a, CFP32B, Rv2660c) для диагностики и дифференциальной диагностики туберкулезной инфекции у детей.

8. Разработать и обосновать алгоритм персонифицированной диагностики туберкулезной инфекции у детей.

Научная новизна

Стратифицированы и выделены дополнительные анамнестические и клинические факторы, которые можно рассматривать в качестве предикторов (прогностических факторов) ЛТИ и ТБ у детей.

Выявлены новые механизмы в патогенезе туберкулеза, обусловленные генетическими мутациями и особенностями специфического иммунного ответа, определены признаки прогрессирования туберкулезной инфекции у детей.

Проведен комплексный анализ взаимосвязи клинических, иммунологических показателей и генетических изменений при ТБ у детей.

Впервые установлено, что маркером высокого риска прогрессирования туберкулезной инфекции у детей является гетерозиготный генотип полиморфного варианта T-1488C гена *IFNG*. При этом в качестве дополнительного генетического показателя риска прогрессирования и тяжелого течения заболевания у детей впервые установлен гетерозиготный генотип полиморфизма C-2508T гена *MCP1*. Зарегистрирована база данных «Молекулярно-генетические предикторы туберкулезной инфекции у детей» (2017620361 RU).

Определены специфические белки - маркеры (ESAT6-CFP10, ESAT6, 85a, Rv2660c и CFP32B) латентной и активной туберкулезной инфекции у детей. Разработан способ оценки активности туберкулезной инфекции у детей и подростков (2586279 RU).

На основании всесторонней оценки анамнестических, клинических, молекулярно-генетических признаков и уровня специфического иммунного ответа в зависимости от стадии туберкулезной инфекции у детей разработаны две программы для ЭВМ по выявлению и ранней диагностике туберкулезной инфекции у детей с определением риска ее прогрессирования (2017610653 RU и 2017610590 RU). Разработан новый алгоритм персонифицированной диагностики туберкулезной инфекции у детей с высоким уровнем диагностической эффективности.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты, полученные в ходе исследования, свидетельствуют об участии генов *IFNG* и *MCPI* в прогрессировании туберкулезной инфекции. Установлены специфические антигены, ответственные за раннюю стадию ЛТИ. Определена связь клинического состояния ребенка, специфического иммунного ответа и генотипа полиморфного варианта гена *IFNG*, что значительно расширяет представление об иммунопатогенезе ТБ.

Данные о наличии гетерозиготного генотипа полиморфного варианта гена *IFNG* (Т-1488С) могут использоваться в качестве дополнительного критерия при формировании групп высокого риска прогрессирования ЛТИ, а гетерозиготный генотип полиморфного варианта гена *MCPI* (С-2508Т) – прогрессирования ТБ в первую очередь у детей, имеющих социальные факторы риска. Определение значимого генотипа полиморфизма гена *IFNG* необходимо включать в диагностический алгоритм для персонифицированной ранней диагностики туберкулезной инфекции у детей.

Выявлены специфические иммунологические критерии, связанные с различными клиническими стадиями туберкулезной инфекции (от ее отсутствия до развития активного ТБ), позволяющие дифференцировать латентную и активную инфекцию.

По результатам комплексной оценки анамнестических, клинических, иммунологических и молекулярно-генетических данных разработан алгоритм: для педиатрического этапа – определяющий высокий риск ЛТИ, для фтизиатрического – дифференцирующий латентную и активную инфекцию, а также оценивающий риски прогрессирования ЛТИ у детей, что дает возможность своевременно организовать профилактические мероприятия.

Методология и методы исследования

Настоящая работа выполнена согласно принципам доказательной медицины. Для выполнения диссертационного исследования применялись методы, основанные на принципах общенаучной и частнонаучной методологии, общелогические (анализ и синтез) и эмпирические (изучение и анализ научной литературы, наблюдение, исследование), а также статистические методы, соответствующие цели и задачам работы. Исследование проспективное, поперечное, соответствует основным методологическим принципам (комплексность, целостность, объективность и

достоверность). В работе использованы современные специальные методы исследования: выделение ДНК из цельной крови, аллель-специфическая ПЦР для генотипирования, количественное определение ИФН- γ с использованием ИФА. Работа является самостоятельным фрагментом плановой научно-исследовательской работы федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Омский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации» (ОмГМУ) (№ гос. регистрации АААА-А15-115123110105-5 «Разработка новых программ и технологий снижения потерь здоровья детского населения»). Базой проведения научного исследования являлся ОмГМУ, кафедра педиатрии ДПО. Клиническая часть работы организована на базе КУЗ ОО «Специализированная детская туберкулезная клиническая больница» (главный врач – А. Л. Ванюков), КУЗ ОО «Клинический противотуберкулезный диспансер» (главный врач – М. П. Татаринцева), БУЗ ОО «Городская детская клиническая больница № 2 им. В. П. Бисяриной» (главный врач – А. П. Пилипенко) г. Омска. Иммунологические и молекулярно-генетические исследования проведены на базе ФБУН «Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора (директор – Н. В. Рудаков) (соглашение о научно-исследовательской работе от 19.06.2014). На проведение исследований получено разрешение этического комитета ОмГМУ. Для участия детей в исследовании от родителей или их законных представителей было получено добровольное информированное согласие.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Основными прогностическими факторами риска для развития ЛТИ явились медико-биологические, для ТБ – социальные. Клинические проявления туберкулезной инфекции у детей не претерпели существенного патоморфоза в современных условиях. Иммунологический ответ при ЛТИ характеризовался активацией Т-клеток и повышением спонтанного уровня ИФН- γ , а при развитии заболевания – его недостаточной продукцией.
2. У детей с ЛТИ гомозиготный генотип по аллелю Т полиморфного варианта гена *IFNG* (Т-1488С) встречался чаще, чем у больных туберкулезом. Гетерозиготный генотип полиморфизма гена *IFNG* (Т-1488С) связан с риском развития заболевания, его прогрессированием и ассоциирован со снижением выраженности

иммунного ответа против отдельных МБТ-антигенов (ППД-Л, ESAT6-CFP10, ESAT6, 85a, CFP32B, Rv2660c).

3. Установлено, что белки ESAT6 и Rv2660c являются маркерами ранней стадии развития ЛТИ, а гибридный белок ESAT6-CFP10 – активной туберкулезной инфекции, преимущественно на стадии развития заболевания.
4. Установлен высокий уровень диагностической эффективности (95,1%) разработанного «Алгоритма персонифицированной диагностики туберкулезной инфекции у детей» с использованием комплекса клинических, иммунологических и молекулярно-генетических критериев.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Степень достоверности результатов определяется соответствием дизайна исследования критериям доказательной медицины, достаточным объемом наблюдений, репрезентативностью комплексного обследования пациентов с использованием современных лабораторных методов исследования и обработки полученных данных в соответствии с поставленными задачами, методами статистического анализа с использованием программных пакетов анализа OpenEpi версия 3, Statistica 6,0 и StatPlusPro 5.9.8. Сформулированные задачи соответствуют цели исследования. Результаты исследования, положения, выводы и практические рекомендации аргументированы фактическим материалом и логически вытекают из анализа полученных данных. Размер выборки пациентов (310 детей), достаточный для получения доказательных данных, был рассчитан в программе OpenEpi версия 3, исходя из генеральной совокупности детей Омской области на 2013 г. (378900) и отчетных форм по туберкулинодиагностике.

Основные положения работы были представлены и доложены на различных научных форумах: II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы профилактики, диагностики и лечения туберкулеза у детей и подростков» (Москва, 2014); VIII Российском форуме с международным участием «Здоровье детей: профилактика и терапия социально-значимых заболеваний. Санкт-Петербург-2014»; 3-м Конгрессе Национальной ассоциации фтизиатров (Санкт-Петербург, 2014); XIII Международном конгрессе «Современные проблемы иммунологии, аллергологии и иммунофармакологии»

(Москва, 2015); III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы профилактики, диагностики и лечения туберкулеза у детей и подростков» (Москва, 2015); VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы внутренней патологии. Дисплазия соединительной ткани» (Омск, 2015); IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы профилактики, диагностики и лечения туберкулеза у детей и подростков» (Ялта, 2016); II Съезде врачей общей практики (семейных врачей) Сибирского федерального округа (Омск, 2016); V Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы профилактики, диагностики и лечения туберкулеза у детей и подростков» (Казань, 2017); 6-м Конгрессе Национальной ассоциации фтизиатров (Санкт-Петербург, 2017); VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы профилактики, диагностики и лечения туберкулеза у детей и подростков» (Сочи, 2018).

Апробация диссертации состоялась на совместном заседании кафедр педиатрии ДПО, госпитальной педиатрии, педиатрии, пропедевтики детских болезней и поликлинической педиатрии, детских инфекционных болезней ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Омск 21 сентября 2018 года.

Личный вклад автора

Автор осуществляла разработку общей концепции и дизайна исследования, лично проводила выполнение всех этапов работы: сбор клинического и биологического материала, статистическую обработку данных, обобщение, интерпретацию научных результатов, обсуждение результатов исследования и формирование выводов. В соавторстве написала и опубликовала печатные работы в журналах, рекомендованных Перечнем ВАК, в которых отражены полученные результаты исследования.

Диссертационное исследование выполнено при поддержке Гранта РФФИ №16-16-55001/16-17 «Новые возможности профилактики туберкулеза как социально значимого заболевания у детей» по изучению молекулярно-генетических предикторов ЛТИ для совершенствования профилактических мероприятий по ТБ у детей Омской области.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 36 печатных работ: 16 статей в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для публикации основных научных результатов исследований; из них 3 статьи – в изданиях, цитируемых в международной базе данных SCOPUS; тезисы докладов – 16; патент на изобретение – 1, база данных – 1; программы для ЭВМ – 2.

Объем и структура диссертации

Материал диссертации изложен на 258 страницах компьютерного текста, иллюстрирован 51 таблицами и 35 рисунками. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, результатов собственных исследований, заключения с обсуждением результатов, выводов, рекомендаций практическому здравоохранению, списка использованной литературы, содержащего 485 источников (132 отечественных и 353 – зарубежных авторов).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Общая характеристика группы обследованных больных

Исследование выполнено в период с 2014 по 2018 гг. Группу наблюдения составили 310 детей, из них 110 – с установленным диагнозом ТБ, 156 – с ЛТИ, 44 – не инфицированных МБТ. Дизайн исследования представлен на рисунке 1.

Всем пациентам проводилась комплексная оценка состояния здоровья. Обследование включало стандартные общеклинические, клинико-рентгенологические и лабораторные исследования согласно Приказу МЗ РФ № 109 от 21.03.2003 и клиническим рекомендациям по ЛТИ (2015). Оценку чувствительности к туберкулину (ППД-Л) по пробе Манту с 2ТЕ и к препарату ДИАСКИНТЕСТ® (аллерген туберкулезный рекомбинантный – АТР, CFP10-ESAT6 0,2 мкг) проводили в динамике и на момент включения в исследование. Вакцинацию БЦЖ или БЦЖ-М оценивали как результативную при наличии рубца 4 мм и более и поствакцинальной аллергии.

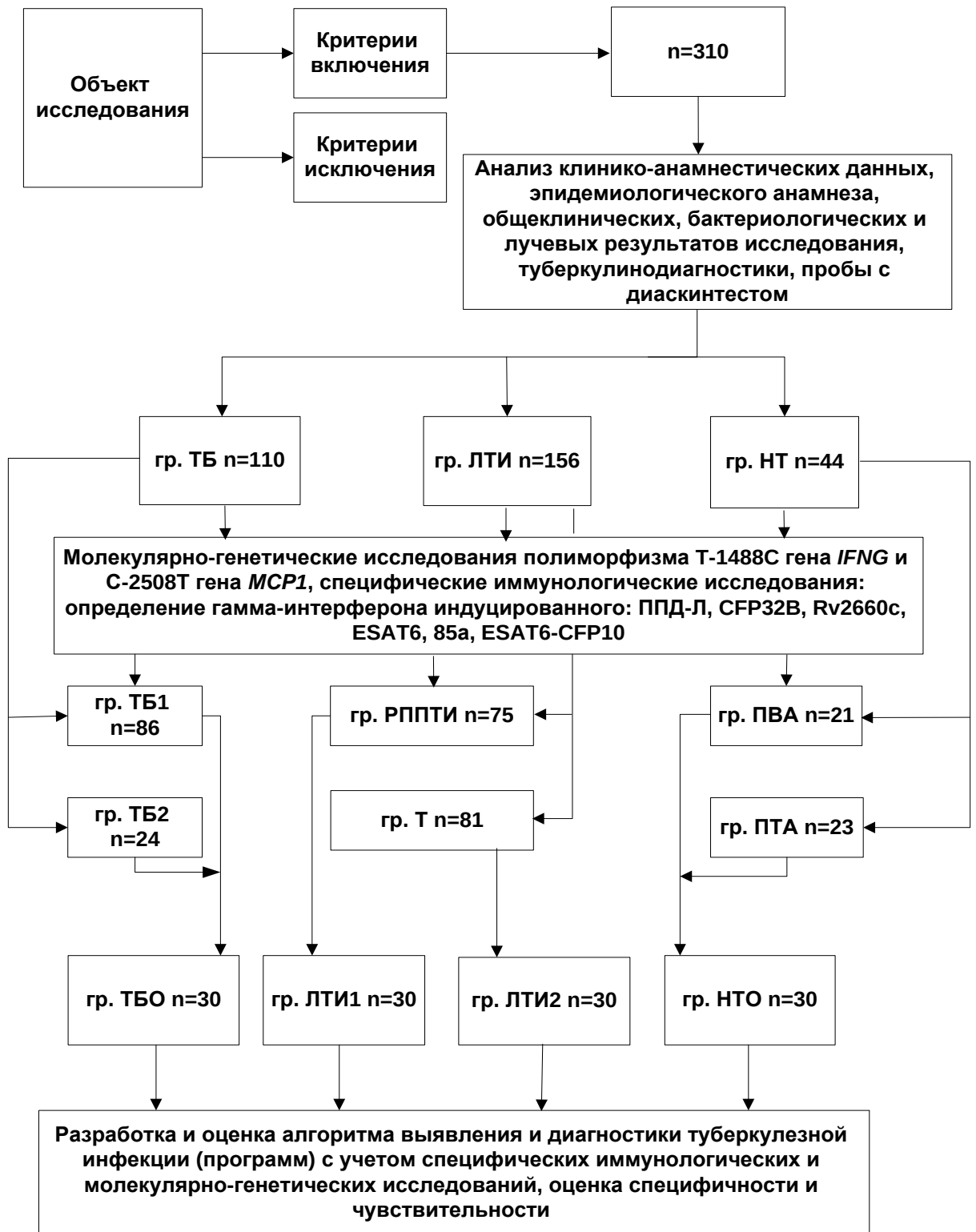


Рисунок 1 – Дизайн исследования

Проведены иммунологические исследования: определение уровня иммуноглобулинов (Ig) G, A, M (по методу Manchini et al., 1970) и Ig E (иммуноферментным методом – ИФА) в сыворотке крови; оценка фагоцитарной

активности нейтрофилов по их способности поглощать инертные частицы латекса (по методическим рекомендациям Б. В. Пинегина с соавт., 1987) и в тесте с нитросиним тетразолием (НСТ-тест) спонтанном и стимулированном, с определением коэффициента прироста (по методу В. Н. Park et al., 1970); оценка субпопуляционного состава Т-клеток (CD) с использованием панели моноклональных антител фирмы DAKO (Дания). Определение уровня ИФН- γ спонтанного и стимулированного специфическими антигенами в цельной крови (ППД-Л, CFP32В, Rv2660с, ESAT6, 85а, ESAT6-CFP10) (М. А. Плеханова с соавт., патент РФ № 2586279) проводили всем детям. Для количественной оценки ИФН- γ использовали ИФА тест-системы, предназначенные для определения ИФН- γ («Вектор-Бест», г. Новосибирск) в супернатантах. Результат оценивали в пг/мл и индексе стимуляции (и.с.).

Из общего числа (310) обследованных у 169 детей провели молекулярно-генетические исследования: выделение ДНК и генотипирование двух полиморфных маркеров С-2508Т гена *MCP1* (rs1024611) и Т-1488С гена *IFNG* (rs2069705). При молекулярно-генетическом анализе выполняли выделение ДНК из периферической крови согласно инструкции набора «ДНК-кровь» («ТестГен», Россия), с использованием аллель-специфической полимеразной цепной реакции (ПЦР) генотипировали полиморфные маркеры Т-1488С гена *IFNG* и С-2508Т гена *MCP1*. Использовали наборы для ПЦР в модификации FLASH (производитель «ТестГен», Россия) и амплификатор iQ5 (производитель «BioRad», США) согласно инструкциям производителей.

Для проведения статистической обработки фактического материала применялись методы статистического анализа с использованием пакета программ OpenEpi версия 3, Statistica 6,0 и StatPlusPro 5.9.8. Определяли $M \pm SEM$; доверительный интервал с уровнем $p = 0,95$ (95% CI или 95% ДИ) при нормальном распределении или медиану (ME); квартиль верхний и нижний $p = 0,25$ и $p = 0,75$ ($Q_{25\%}$: $Q_{75\%}$) при распределении значений, отличном от нормального. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента (t) (при нормальном типе распределения переменных) и по критериям для множественных сравнений. Использовали однофакторный дисперсионный анализ, непараметрические критерии: Манна-Уитни (U), Краскела-Уоллиса (H), хи-квадрат (χ^2 , Пирсона). Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p \leq 0,05$. Анализ связи нескольких признаков осуществляли с помощью подсчета коэффициента корреляции Спирмена (r).

Для классификации информации при формировании групп по качественному и количественному сходству применяли кластерный анализ. Оценивали чувствительность и специфичность диагностических тестов с 95% ДИ (CI), а также риски (коэффициент риска, RR) и отношение шансов (ОШ или OR). Теорема Байеса [Л. Ластед, 1971] применялась для оценки вероятности наличия ЛТИ или ТБ в конкретном симптомокомплексе, оценивали шансы (ОШ (OR) или логарифмические отношения правдоподобия (L), если шанс конкретного симптома больше единицы, то данный симптом встречается чаще, чем в половине процентов случаев. Байесовская модель была использована в разработанных диагностических компьютерных программах (алгоритме) для обработки поступающей информации о пациентах с подозрением на ТБ или ЛТИ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Клиническая характеристика детей, включенных в исследование

В группе «ТБ» было обследовано 110 детей, больных ТБ. Средний возраст составил $9,5 \pm 0,5$ лет, каждый второй ребенок (51; 46,6%) был в возрасте до 8 лет, каждый четвертый (26; 23,6%) – подросткового возраста (15–18 лет). Следует отметить, что среди больных ТБ не отмечалось достоверных различий по половому признаку ($p > 0,05$). Заболевание ТБ у 59 детей (53,6%) было выявлено по результатам массовой туберкулинодиагностики, из них в 13 случаях – с одновременным выявлением семейного очага ТБ. При обследовании по поводу контакта с больными ТБ диагноз был установлен у 29 детей (26,4%). При плановых флюорографических осмотрах выявлено 15 (13,6%) заболевших детей. За медицинской помощью с жалобами со стороны респираторного тракта и симптомами интоксикационного характера обратилось 7 (6,4%) детей, из них в одном случае – с одновременным выявлением очага ТБ. Данные эпидемиологического анамнеза свидетельствовали о том, что контакт с больным ТБ был установлен у 74 заболевших детей (67,3%), при этом тесный семейный контакт – у 47 ($n = 74$; 63,5%) детей. На момент диагностики заболевания 17 детей ($n = 74$; 23%) были под наблюдением по IV группе диспансерного учета (только каждый четвертый ребенок!), средний срок наблюдения составил $2,8 \pm 0,5$ (ДИ 95% 1,8–3,8) лет, в половине случаев (9; 52,9%) заболевание развивалось в первые два года контакта. В 5 случаях ($n = 74$; 6,8%) дети были из «очага смерти». В контакте с больными активной формой ТБ

с бактериовыделением находилось 56 заболевших детей ($n = 74$; 75,7%), из них в 37 случаях ($n = 56$; 66,1%) установили высокий риск лекарственной резистентности (у источника регистрировали множественную лекарственную устойчивость – МЛУ). По результатам динамики ежегодной туберкулинодиагностики среди детей, заболевших ТБ, в 44 случаях (40%) регистрировали инфицирование МБТ до трех лет, что косвенно могло свидетельствовать о семейном или родственном контакте по ТБ. Пропуск раннего периода первичной туберкулезной инфекции (РППТИ) или «виража» туберкулиновых проб выявлен у 50 детей (45,5%), что в 22 случаях ($n = 50$; 44%) явилось причиной поздней диагностики ТБ.

У детей, включенных в группу «ТБ» по данным туберкулинодиагностики (проба Манту с 2ТЕ ППД-Л), средний размер инфильтрата составил $12,6 \pm 0,4$ мм (95% ДИ 11,8–13,5 мм), по результатам пробы с АТР средний размер инфильтрата составил $14,95 \pm 0,5$ мм (95% ДИ 13,9–16,0 мм). Среди детей, больных ТБ, в основном регистрировали положительные нормергические реакции на туберкулин ($n = 110$; 70,9%) и гиперергические ($n = 109$; 67,9%) на АТР.

Диагноз «туберкулез» устанавливался по результатам комплексного обследования и решения центральной врачебно-контрольной комиссии (ЦВКК) согласно принятой клинической классификации ТБ (Приказ МЗ РФ № 109 от 21.03.2003, приложение № 2). Среди детей с диагнозом «туберкулез» в 20,9% ($n = 23$) установили инфильтративный ТБ легких (ИТЛ), по одному случаю – очаговый (0,9%), диссеминированный (0,9%) ТБ легких (ОТЛ, ДТЛ) и туберкулезный плеврит (ТП) (0,9%), в 34,5% ($n = 38$) – первичный туберкулезный комплекс (ПТК) и в 41,8% ($n = 46$) – ТБ внутригрудных лимфатических узлов (ТВЛУ). В четырех случаях (3,6%) регистрировали сочетанное поражение ТБ органов дыхания с другими органами (поражение периферических лимфатических узлов, плечевой кости, кишечника) и в четырех случаях (3,6%) – осложненное течение туберкулезного процесса (ателектаз, экссудативный плеврит, легочная диссеминация, кровохарканье). У большинства пациентов выявили ТБ в фазе инфильтрации – 60,9% ($n = 67$), в фазе распада и обсеменения – у 10,9% ($n = 12$), уплотнения и рассасывания – у 0,9% ($n = 1$), кальцинации – у 26,4% ($n = 29$). Бактериовыделение (МБТ+) регистрировали только в 12 случаях (10,9%), из них в шести случаях установлена лекарственная устойчивость (ЛУ) к основным противотуберкулезным препаратам (H, R, S, Z, E).

Среди детей до 15 лет чаще регистрировали ТВЛУ или ПТК – 81 случай ($n = 84$; 96,4%), при этом среди детей старше 7 лет чаще в фазе кальцинации – 20 случаев ($n = 29$; 69%; $\chi^2 = 3,90$; $p = 0,048$), что свидетельствовало о позднем выявлении ТБ. В подростковом возрасте (старше 15 лет) в основном регистрировали ИТЛ – 22 случая ($n = 23$; 95,7%), при этом в половине случаев ($n = 22$; 10; 45,5%) в фазе распада и обсеменения с МБТ+, что также свидетельствовало о поздней диагностике ТБ. В целом выявленная патология отражала современную структуру заболеваемости ТБ детей [В. А. Аксенова, 2016].

Данные о противотуберкулезной вакцинации имелись у всех заболевших детей. Среди них только двое не были вакцинированы БЦЖ или БЦЖ-М. Среди вакцинированных (108; 98,2%), оценивая результативность вакцинации, установили, что она оказалась эффективной только у 31 (28,7%) заболевшего ребенка.

В группе «ЛТИ» было обследовано 156 детей, средний возраст которых составил $6,6 \pm 0,3$ лет, большая часть детей (110; 70,5%) была в возрасте до 8 лет, также отсутствовали достоверные различия по половым признакам ($p > 0,05$). ЛТИ у детей выявлена по результатам туберкулинодиагностики и комплексного обследования, исключающего ТБ (Приказ МЗ РФ № 109 от 21.03.2003; ЛТИ, клинические рекомендации, 2014, 2015). У 75 детей (48,1%) установили РППТИ, а у 81 ребенка (51,9%) – ранее инфицирование МБТ (тубинфицирование – Т). Данные эпидемиологического анамнеза свидетельствовали о том, что контакт с больным ТБ был у 19 детей (12,2%), при этом тесный семейный контакт – у 8 ($n = 19$; 42,1%). В 14 случаях ($n = 19$; 73,7%) у источника установили МБТ+ и в двух случаях ($n = 14$; 14,3%) – МЛУ.

По данным динамики ежегодной туберкулинодиагностики среди детей с ЛТИ, в 52 случаях (33,3%) регистрировали инфицирование МБТ до трех лет. Пропуск РППТИ или «виража» туберкулиновых проб выявлено у 24 ранее инфицированных МБТ детей ($n = 81$; 29,6%).

У детей, включенных в группу «ЛТИ» по результатам пробы Манту с 2ТЕ ППД-Л, средний размер инфильтрата составил $10,3 \pm 0,3$ мм (95% ДИ 9,7–10,9 мм), пробы с АТР – $1,9 \pm 0,4$ мм (95% ДИ 1,2–2,65 мм). Среди детей с ЛТИ на туберкулин в основном регистрировали положительные нормергические реакции ($n = 156$; 96,8%), на АТР – отрицательные ($n = 156$; 81,4%).

Противотуберкулезная вакцинация была проведена 155 детям (99,4%) и у большинства была эффективной – 97 (62,6%).

В группе не инфицированных МБТ («НТ») обследовано 44 ребенка, средний возраст составил $3,1 \pm 0,4$ года, большая часть (42; 95,5%) была до 8 лет, из них мальчиков было больше (28; 63,6%) ($\chi^2 = 5,500$; $p = 0,019$).

Среди детей группы «НТ» вакцинировано против ТБ 36 детей (81,8%), в связи с отказом не было вакцинировано 8 человек (18,2%). При оценке результативности вакцинации установили, что она оказалась эффективной только у каждого четвертого ребенка (9; 25%). По данным эпидемиологического анамнеза у всех детей группы «НТ» контакты с больными ТБ не были установлены.

По результатам туберкулинодиагностики и исключения ЛТИ у 21 ребенка (47,7%) установили поствакцинальную аллергию (ПВА), у 23 детей (52,3%) – положительную туберкулиновую анергию (ПТА).

У детей с установленной ПВА по данным туберкулинодиагностики (проба Манту с 2ТЕ ППД-Л) средний размер инфильтрата составил $4,1 \pm 0,4$ мм (95% ДИ 3,2–5,0 мм), при этом положительные реакции регистрировали в 9 случаях (42,9%), в остальных случаях (12; 57,1) – сомнительные. По результатам пробы АТР у всех (100%) установили отрицательные реакции.

Учитывая, что ТБ развивается в результате сложного взаимодействия МБТ, макроорганизма и социальных условий среды [Floyd et al., 2018], был проведен сравнительный анализ данных анамнеза в группах наблюдения с выделением предикторов (прогностических факторов), способствовавших формированию у детей ЛТИ и ТБ.

ТБ у детей до сих пор расценивается как социально обусловленное заболевание (Постановление Правительства Российской Федерации от 01.12.2004 № 715 «Об утверждении перечня социально значимых заболеваний и перечня заболеваний, представляющих опасность для окружающих»), что подтвердили и наши исследования. Была установлена роль таких факторов риска ТБ как злоупотребление в семье алкоголем и наркотиками (RR – коэффициент риска 34,040), среднее и средне-специальное образование родителей (RR 2,877) и их безработица (отца – RR 2,704; матери – RR 1,551), неудовлетворительные жилищно-бытовые условия (RR 12,530), а также семьи малообеспеченные (RR 7,942), многодетные (RR 5,247) и неполные (RR 3,359). Впервые

среди социальных факторов риска мы выделили неорганизованного ребенка (RR 1,513). Пассивному курению сегодня придают достаточно большое значение, учитывая высокие риски инфицирования МБТ и развития ТБ [WHO, 2017; Floyd et al., 2018]. Мы в своем исследовании также отметили увеличение риска развития ТБ при наличии курения в семье (RR 1,790). В клинических рекомендациях по ЛТИ (2015) социальные факторы представлены ограниченно и такие, как многодетная, неполная, малообеспеченная семья, низкий уровень образования родителей, неблагоприятные жилищно-бытовые условия, курение в семье, не рассматриваются.

Многочисленные исследования свидетельствуют о возможности сочетания медико-биологических и социально-эпидемиологических факторов, которые могут значительно увеличивать риск прогрессирования инфекции [Л. В. Поддубная, 2007; Ю. П. Чугаев и др., 2014], при этом отмечается, что вклад каждого фактора может быть неравнозначным [С. М. Кушнир и др., 2011; Е. С. Овсянкина и др., 2014]. Как, например, отягощенный наследственный анамнез, указывающий на заболевание ТБ ближайших родственников, в нашем исследовании определен в качестве фактора риска: для развития заболевания у детей на уровне RR 8,036, а для ЛТИ – RR 3,385.

Как показали результаты нашего исследования, низкий социальный уровень семьи мог способствовать реализации и других факторов риска, в том числе эпидемиологических – контакта по ТБ (RR 5,523), как семейного (RR 8,332), так и бытового (RR 3,481). Учитывая, что среди детей, заболевших ТБ, в каждом третьем случае контакт не был установлен (32,7%), по нашему мнению, именно социальные факторы могут выступать в качестве маркеров возможного контакта. Также в качестве фактора риска нами был установлен пропуск «виража туберкулиновых проб» (RR 2,955), ранее на это также указывала в своих исследованиях А. М. Крюкова (2008). При этом в наших исследованиях установленный высокий процент пропуска «виража» (45,5%), даже при наличии контакта с больным ТБ без наблюдения в специализированном учреждении (77%), свидетельствовал об отсутствии профилактических мероприятий для предупреждения ТБ, что могло формировать высокий риск его развития. В качестве фактора неспецифического риска ТБ в настоящее время выделяют ранний возраст детей (до 3-х лет) (в Федеральных клинических рекомендациях по диагностике и лечению ЛТИ у детей, 2015), по результатам нашего

исследования было подтверждено, что инфицирование МБТ в раннем возрасте можно рассматривать в качестве фактора риска развития заболевания (RR 1,200).

Кроме того, нами было установлено, что неблагоприятный биологический анамнез формировал риск развития ТБ. В антенатальном периоде были выделены в качестве факторов риска ТБ вредные привычки матери во время беременности: курение, злоупотребление алкоголем, употребление наркотиков (RR 7,131) и активность хронических инфекций во время беременности (RR 3,467). В интранатальном – патология в период родов (преждевременные, запоздалые или затяжные роды) (RR 1,357). Но до настоящего времени эти факторы не рассматриваются как возможные риски развития ТБ у детей, поэтому не отмечены в клинических рекомендациях по ЛТИ (2015). Однако ранее в единичных работах исследователями обращалось внимание, что на формирование риска заболевания влияли недоношенность и низкая масса тела при рождении [А. Г. Ким, 2005; А. М. Крюкова, 2008], искусственное вскармливание [А. М. Крюкова, 2008]. По результатам нашего исследования мы пришли к выводу, что в раннем постнатальном периоде необходимо выделить несколько факторов, связанных с риском развития ТБ, таких как недоношенность (RR 2,206), низкая масса тела при рождении (до 2500 г) (RR 1,733), с задержкой развития к году (RR 1,95), раннее (до 2 месяцев) искусственное вскармливание (RR 2,056).

Необходимо отметить, что частые респираторные вирусные инфекции у детей, представленные в клинических рекомендациях в качестве фактора риска ТБ (ЛТИ, 2015), не нашли подтверждения в нашем исследовании (RR 0,726), как и перенесенные ОРВИ до года (RR 0,572). Несмотря на отсутствие связи данных факторов с риском развития ТБ, была установлена их связь с развитием ЛТИ (RR 1,156 и RR 1,457, соответственно). Также, согласно нашим данным, среди лиц с ЛТИ отмечались случаи бронхиальной астмы (8,3%) и аллергического ринита (12,2%), при этом среди больных ТБ ни одного случая бронхиальной астмы не было зарегистрировано. Риск развития ЛТИ при формировании хронической бронхолегочной патологии составил RR 3,173. Все это косвенно могло свидетельствовать о недостаточном защитном эффекте местного иммунитета [В. И. Совалкин и др., 2011], что и способствовало заражению МБТ, но не влияло на прогрессирование туберкулезной инфекции. При этом полученные данные не согласуются с работами, указывающими на высокий риск развития ТБ при наличии

хронической бронхолегочной патологии у детей [Е. С. Овсянкина, 2014; Е. В. Белова и др., 2014].

В качестве специфического фактора риска ТБ в раннем постнатальном периоде рассматривается отсутствие (Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению ЛТИ у детей, 2015) или низкая результативность вакцинации БЦЖ (БЦЖ-М) [О. В. Касимцева, 2007; Н. Ю. Русских, 2008], что подтверждено и в нашей работе (RR 1,905). Дополнительно был установлен повышенный риск заболевания при иммунизации вакциной БЦЖ-М (RR 2,87). При этом вакцинация БЦЖ-М являлась прямым отражением отягощенного интранатального и раннего постнатального периодов, что могло повлиять на формирование адаптивного иммунитета. Также по результатам нашего исследования впервые установлен риск развития ЛТИ (RR 3,219) у детей с нарушениями календаря профилактических прививок (вакцинация по индивидуальному графику), что косвенно могло влиять на эффективность формирования адаптивного иммунитета. При этом данные нарушения не увеличивали риск развития ТБ (RR 0,722).

Таким образом, анализ анамнестических данных показал, что основными предикторами прогрессирования туберкулезной инфекции являлись социальные факторы, для инфицирования (заражения) МБТ – медико-биологические.

Сравнительный анализ результатов клинического и лабораторного обследования детей в период ЛТИ и заболевания ТБ позволил установить, что у детей с ЛТИ чаще выявляли нарушения носового дыхания за счет аденоидных вегетаций (16%, $p = 0,00008$), что в 5 случаях ($n = 25$, 20%) сочеталось с аллергическим ринитом, очаги хронической инфекции (18,6%, $p = 0,027$) и проявления аллергических заболеваний верхних и нижних дыхательных путей (15,4%, $p = 0,000008$), также чаще регистрировали избыточную массу тела (10,3%, $p = 0,044$). Для ТБ значимыми являлись проявления интоксикационного (ОШ 2,393) и бронхолегочного (ОШ 1,200) синдромов, а также такие клинические симптомы как гепатоспленомегалия (ОШ 2,583 и 3,800) и дефицит массы тела (белково-энергетическая недостаточность) (ОШ 1,898). По данным лабораторного исследования крови, для ТБ были более характерны анемия (ОШ 1,872), повышение СОЭ (ОШ 2,255), лимфоцитоз (ОШ 1,634) и эозинофилия (ОШ 5,371). При этом, что касалось эозинофилии среди детей, больных ТБ (40, 36,4%), только в 4 случаях (10%) была связана с паразитарными инвазиями. Поэтому в целом изменения,

регистрируемые при ТБ, характеризовали течение специфического воспалительного процесса, полученные результаты позволяли предположить и наличие иммунологических изменений при развитии ТБ у детей.

Учитывая риски, на этапе формирования ЛТИ и ее прогрессирования с формированием локального специфического процесса у детей, мы посчитали необходимым провести оценку состояния врожденного и адаптивного иммунитета. Сравнительные данные результатов иммунного статуса по исследованию крови детей с ЛТИ, больных ТБ и НТ, показали, что достоверных различий иммунологических показателей среди детей с ЛТИ и НТ не было установлено ($p > 0,05$), за исключением оценки уровня спонтанного ИФН- γ (пг/мл) ($p \leq 0,05$). Опубликованы данные, что ИФН- γ принимает активное участие как во врожденном, так и адаптивном иммунном ответе против туберкулезной инфекции [K. L. Chinetal, 2017].

Мы установили, что на этапе ЛТИ имеется активация клеточного ответа за счет повышения количества клеток с рецепторами CD3, CD4, CD8. CD4 Т-лимфоциты играют центральную роль во всех адаптивных иммунных процессах [T. L. Turtleetal, 2016; J. I .Gray, et al., 2018]. Их активация наблюдается во время первичной реакции для защиты от возбудителя [J. I. Gray, et al., 2018]. CD4 Т-лимфоциты действуют совместно с врожденными и другими адаптивными иммунными клетками для защиты от патогенна, при этом поддерживают активацию CD8 Т-лимфоцитов [J. I. Gray et al., 2018]. Именно эти клетки являются основными продуцентами ИФН- γ и могут влиять на повышение уровня спонтанно синтезируемого цитокина [M. Travaretal, 2016], что установлено и в нашем исследовании ($p < 0,05$). Однако антигенная нагрузка не создавала условия для гиперактивации клеточного ответа. В период развития ТБ ИФН- γ оставался на уровне, характерном для ЛТИ ($p > 0,05$), что было недостаточным для защиты от прогрессирования инфекции. В работе Н. Хана с соавт. (2017) указывалось, что при хронических инфекциях (таких как туберкулез), отмечается снижение функции Т-клеток, в том числе секреции цитокинов. При активации клеточного иммунитета, как показано ранее, продуцентами ИФН- γ являются Th1-лимфоциты (основной активационный маркер – HLA DR) [J. M. Gonzalez-Navajas et al., 2012; L. Desvignes et al., 2012] и натуральные клетки-киллеры (NK-CD16) [S. R. Yoon et al., 2015; M. Travar et al., 2016], следовательно, наблюдаемое в нашем исследовании снижение количества NK-клеток ($p \leq 0,05$) при ТБ могло привести к снижению уровня синтеза цитокина, а

недостаток ИФН- γ мог стать причиной уменьшения активности цитотоксических клеток. В то же время полученные нами данные показали, что при развитии ТБ сохранялся высоким уровень активированных Т-клеток (об этом свидетельствовал высокий уровень основного активационного маркера – HLA DR ($p \leq 0,05$), возможно, компенсируя их сниженную функцию [W. C. Liles et al., 1995].

Учитывая повышенное содержание спонтанно синтезируемого ИФН- γ , можно было ожидать, что содержание IgE будет невысоким, т.к. ИФН- γ , будучи продуктом Th1-лимфоцитов, ингибирует пролиферацию Th2-лимфоцитов и индуцированное IL4 переключение синтеза Ig на IgE [В. К. Козлов, 2010]. Такие изменения содержания IgE мы выявили при ЛТИ. Однако при развитии ТБ отмечено повышение уровня синтеза IgE, и это еще один факт, свидетельствующий о недостаточной продукции ИФН- γ , что ведет к формированию хронического воспаления (заболевания). Рядом исследователей установлена прямая связь между возникновением очагов хронической бактериальной или грибковой инфекции и гиперпродукцией IgE [Г. И. Смирнова, 1998; И. И. Балаболкин и др., 1999]. Наши данные также подтвердили связь между активацией гуморального звена иммунитета ($p \leq 0,05$) и прогрессированием туберкулезной инфекции [М. М. Авербах, 1976; Е. В. Свирщевская и др., 2005].

ИФН- γ рассматривается как важнейший фактор активации макрофагов [С. А. Кетлинский и др., 2008]. Макрофаги вносят существенный вклад в реализацию врожденного иммунитета и в формирование адаптивного иммунитета [S. Pahari et al., 2018], обеспечивая антимикобактериальную защиту, в том числе через регуляцию синтеза про- и противовоспалительных цитокинов [С. Н. Liu et al., 2017; S. Pahari et al., 2018]. Цитокины привлекают главным образом нейтрофилы из кровотока и инициируют провоспалительный ответ, приводящий к поглощению и разрушению МБТ [S. Pahari et al., 2018]. В нашем исследовании отмечено снижение фагоцитарной активности клеток при развитии ТБ, что также косвенно может свидетельствовать о недостаточной продукции ИФН- γ .

Таким образом, в период ЛТИ нами установлена некоторая активация клеточного ответа, что согласуется с исследованиями последних лет по ЛТИ [М. А. Nuaman et al., 2016]. При развитии ТБ не было установлено изменений, указывающих на формирование иммунодефицита, хотя многими авторами отмечено возникновение заболевания на фоне вторичного иммунодефицита [Б. Е. Бородулин и др., 2013;

M. De Martino et al., 2014]. По нашему мнению, изменения показателей иммунной защиты характеризовали особенности течения воспалительного процесса при ТБ у детей, в том числе его хронизацию, где ключевым механизмом являлось снижение функциональной активности клеток, а, в частности, недостаточная выработка ИФН- γ .

Собственные и ранее полученные результаты свидетельствуют о важности CD4-опосредованного иммунитета и ИФН- γ в базовой устойчивости к МБТ и возникновению заболевания, но полностью не раскрывают механизмы их развития [L. Abel et al., 2014]. В этом контексте идентификация генетических факторов риска ТБ (в данном случае полиморфные варианты гена, кодирующего ИФН- γ (*IFNG*)), позволит ближе подойти к расшифровке основ патогенеза данного инфекционного заболевания. Поэтому следующей задачей нашей работы явилась оценка значимости генетических факторов при развитии туберкулезной инфекции у детей.

Как один из перспективных для изучения при ТБ рассматривался полиморфный вариант гена *IFNG* (T-1488C), так как наличие данной мутации (однонуклеотидной замене цитозина на тимин) может сказываться на экспрессии гена *IFNG* [Д. С. Ожегова, 2009] и, следовательно, синтезе белка. Необходимо подчеркнуть, что публикаций по исследованию данного полиморфизма у детей с ТБ или ЛТИ в доступных источниках не найдено. Оценивая функциональную значимость полиморфного варианта гена *IFNG* (T-1488C) в механизмах иммунологической защиты против МБТ и для определения связи с ТБ у детей, нами впервые было установлено, что маркером высокого риска развития ТБ (ОШ = 4,667, 95% ДИ 1,236-17,62; $p = 0,008$) как при первичном (47,5%), так и вторичном (65%) по генезу варианту заболевания и его неблагоприятном течении являлся гетерозиготный генотип. Вероятный риск прогрессирования заболевания при данном варианте установлен на уровне 74,07% (95% ДИ от 63,54 до 82,43%).

Нами была выявлена ассоциация значимого для ТБ гетерозиготного генотипа полиморфного варианта T-1488C гена *IFNG* с особенностями течения специфического процесса: преимущественно правостороннего (ОШ 2,294) поражения легких, с объемом от двух (ОШ 1,424) и более (ОШ 1,211) сегментов, с формированием инфильтратов (ОШ 1,737), с признаками деструкции (ОШ 1,458) легочной ткани и диссеминации (ОШ 1,75), а также плеврита (ОШ 1,9), и бактериовыделением МБТ (ОШ 1,458). Установлена связь гетерозиготного генотипа полиморфного варианта T-1488C гена *IFNG* с такими клиническими проявлениями ТБ как параспецифические реакции (ОШ 2,059) с

развитием периферической лимфаденопатии (ОШ 2,4), гепатоспленомегалия (ОШ 5,5), дефицит массы тела (ОШ 1,429), анемия (ОШ 2,059) и повышение уровня СОЭ (ОШ 3,4).

По результатам кластерного анализа, независимо от стадии туберкулезной инфекции, выявлено преобладание гетерозиготного генотипа изучаемого полиморфного варианта гена *IFNG* среди детей, имеющих следующих факторы риска: отягощенный анамнез по ТБ (F30,865; $p = 0,000$), низкую массу тела при рождении (до 2500 г) (F92,515; $p = 0,000$), искусственное вскармливание (F8,31; $p = 0,000001$). Кроме того, определена высокая вероятность (59,38%; 95% ДИ от 42,23 до 74,62%) формирования низкой результативности вакцинации БЦЖ (БЦЖ-М) (F4,946; $p = 0,004$) у детей с гетерозиготным генотипом изучаемого полиморфизма. В свою очередь низкая результативность вакцинации у детей может быть косвенным признаком, свидетельствующим о гетерозиготном генотипе полиморфного варианта T-1488C гена *IFNG*.

При развитии ТБ мы установили, что ведущими факторами в реализации высокого риска при гетерозиготном генотипе полиморфного варианта T-1488C гена *IFNG* являлись низкий достаток (F31,994; $p = 0,0000$), курение в семье (F5,193; $p = 0,003$) и отсутствие грудного вскармливания (F6,965; $p = 0,0004$). Данные факторы риска можно отнести к внешним факторам, влияющим на эпигенетические модификации генома. В настоящее время эпигенетическим процессам придают большое значение [G. Kelsey et al., 2017; C. D. Heijden et al., 2017], так как, не затрагивая содержание наследственной информации, они играют большую роль в экспрессии генов [G. Kelsey et al., 2017; C. D. Heijden et al., 2017]. Считается, что генетические и эпигенетические модификации, в том числе при развитии туберкулеза, могут зависеть от экологических (в частности, от табачного дыма [S. Prasad et al., 2017]) и диетических факторов [I. Romieu et al., 2002; A. Marcos et al., 2003]. В настоящее время именно эпигенетические процессы определяют комплексные отношения между генетикой, окружающей средой, образом жизни и заболеваниями [M. M. Esterhuysen et al., 2015]. Полученные нами результаты по оценке значимости полиморфизма гена *IFNG* для туберкулезной инфекции позволили установить, что гетерозиготный генотип полиморфного варианта T-1488C гена *IFNG* определялся и у части детей с ЛТИ (40,3%), поэтому отсутствие факторов риска

заболевания, влияющих на эпигенетические процессы, могут объяснить факт отсутствия ТБ у данной группы пациентов.

Учитывая, что в наших исследованиях был установлен недостаточный защитный уровень ИФН- γ при развитии ТБ у детей, мы предположили возможный вклад в патогенез заболевания однонуклеотидной замены гена *IFNG*. Тем более что ранее была установлена [Д. С. Ожегова, 2009] взаимосвязь полиморфизма Т-1488С гена *IFNG* с уровнем экспрессии гена *IFNG*, но не изучалась связь с уровнем продукции соответствующего цитокина (при индукции антигенами МБТ).

С целью выявления связи генотипов полиморфного варианта Т-1488С гена *IFNG* с уровнем продукции ИФН- γ после стимуляции специфическими антигенами (CFP32В, Rv2660с, ESAT6, 85а, ESAT6-CFP10) было проведено дополнительное исследование. В результате впервые было определено, что полиморфизм гена *IFNG* (Т-1488С) ассоциирован с различной выраженностью иммунного ответа против отдельных МБТ-антигенов (табл. 1).

Таблица 1 – Уровень продукции индуцированного ИФН- γ (пг/мл) специфическими антигенами в зависимости от генотипов полиморфного варианта Т-1488С гена *IFNG* при ТБ, МЕ ($Q_{25\%}$: $Q_{75\%}$)

Специфические антигены	группа «ТБ», N=81		Критерий Манна-Уитни (U), p
	генотип		
	ТС, n=42	ТТ и СС, n=39	
ППД-Л	1001,6 (698:1200)	1380,7 (741,5:1294,5)	U = 703,5; p = 0,275
CFP32В	69,8 (10,2:68)	95,8 (21:122,5)	U = 554,5; p = 0,018
Rv2660с	102,6 (12,2:83)	149,6 (37,5:195,5)	U = 513; p = 0,006
ESAT6	101,5 (10,9:57,4)	112,8 (26:173)	U = 523,5; p = 0,005
85a	65 (0,2:40)	90,3 (6,5:101)	U = 549,5; p = 0,016
ESAT6-CFP10	440,4 (139:761)	549,5 (187:1133)	U = 768; p = 0,630

Анализ результатов исследования, представленный в таблице 1, показал, что при развитии ТБ определена связь между генотипом полиморфного варианта гена *IFNG* (Т-1488С) и уровнем индуцированного ИФН- γ . Установлено, что уровень индуцированного

ИФН- γ (на антигены: CFP32В, Rv2660с, ESAT6, 85а) значимо снижался при гетерозиготном генотипе полиморфного варианта T-1488C гена *IFNG*.

Проведенный кластерный анализ показателей у детей, больных ТБ и с ЛТИ, позволил в зависимости от генотипов полиморфного варианта T-1488C гена *IFNG* и уровня продукции ИФН- γ (по и.с.) выделить 3 группы (кластера) (рис. 2).

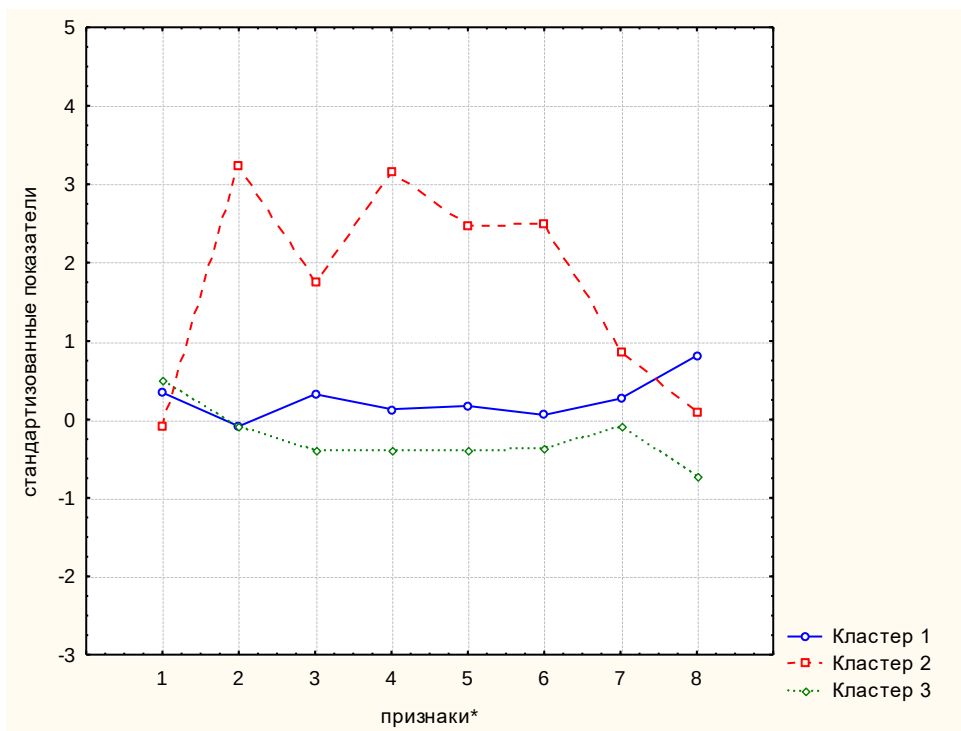


Рисунок 2 – Кластерный анализ по стандартизованным показателям уровня ИФН- γ индуцированного специфическими антигенами (и.с.) в зависимости от генотипов полиморфного варианта гена *IFNG* (T-1488C) у детей групп «ТБ» и «ЛТИ»

Примечание: *1 – группы (ТБ-3; ЛТИ-2); 2 – ИФН- γ ППД-Л, и.с.; 3 – ИФН- γ CFP32В, и.с.; 4 – ИФН- γ Rv2660с, и.с.; 5 – ИФН- γ ESAT6, и.с.; 6 – ИФН- γ 85а, и.с.; 7 – ИФН- γ ESAT6-CFP10, и.с.; 8 – INFG_T(-1488)C (1-ТС, 2-ТТ, 3-СС)

Первый и третий кластеры формировали признаки, которые характеризовали ситуацию при развитии ТБ у детей. Первый вариант был связан с гомозиготным генотипом по аллелю С полиморфного варианта гена *IFNG* (T-1488C) и снижением уровня продукции ИФН- γ на стимуляцию белками ранней стадии туберкулезной инфекции (CFP32В, Rv2660с, ESAT6, 85а) при сохранении более выраженного ответа на гибридный белок, чем в третьем кластере. Третий вариант был связан с гетерозиготным генотипом полиморфного варианта гена *IFNG* (T-1488C) и снижением ответа на белки ранней стадии туберкулезной инфекции при сохранении менее выраженного ответа на

ESAT6-CFP10, что позволило также подтвердить ассоциацию гетерозиготного генотипа с низкой продукцией цитокина и высоким риском ТБ.

Второй кластер формировали признаки, которые характеризовали ситуацию при развитии ЛТИ, для нее было характерно наличие гомозиготного генотипа по аллелю Т полиморфного варианта гена *IFNG* (Т-1488С) и высокого уровня продукции ИФН- γ на стимуляцию белками ранней стадии туберкулезной инфекции при низком ответе на гибридный белок, что свидетельствовало о протективной роли генотипа ТТ при полиморфизме гена *IFNG* (Т-1488С), а выраженные реакции на специфические антигены – о формировании адекватного противотуберкулезного иммунитета.

Таким образом, нами впервые определена связь гетерозиготного генотипа при полиморфизме гена *IFNG* (Т-1488С) со снижением продукции индуцированного отдельными МБТ-антигенами ИФН- γ и развитием ТБ, а наличие гомозиготного генотипа по аллелю Т полиморфного варианта гена *IFNG* (Т-1488С) – с высоким уровнем продукции ИФН- γ после специфической стимуляции и формированием противотуберкулезного иммунитета.

Полученные результаты позволили нам утверждать, что выделен еще один генетический маркер (фактор риска – полиморфизм – 1488С/Т гена *IFNG*) развития и прогрессирования ТБ у детей с ЛТИ, реализующийся при наличии социальных и медико-биологических факторов риска, в первую очередь таких как курение в семье, низкий достаток в семье и отсутствие грудного вскармливания.

Учитывая роль хемотаксического для макрофагов белка 1 (MCP1) [С. С. Shu et al., 2013] и иммунного ответа, опосредованного Th2 типа [О. Schreiber et al., 2008], мы посчитали необходимым оценить роль гена *MCP1* в прогрессировании туберкулезного процесса, в качестве дополнительного генетического фактора риска. Для этого был выбран полиморфный вариант С-2508Т гена *MCP1*, учитывая, что ранее были попытки оценить роль гена *MCP1* и его полиморфизм в восприимчивости к ТБ [А. Alcaïs et al., 2005; Д. С. Ожегова, 2009]. Так, мы установили, что гетерозиготный генотип изучаемого полиморфизма гена *MCP1* связан с прогрессированием заболевания, при этом вероятность его прогрессирования составила 76,54% (95% ДИ от 66,17 до 84,51%).

Полученные нами результаты позволили говорить о ТБ как о гетерогенном хроническом заболевании, тем самым подчеркивая участие многих, в том числе генетических, факторов в его развитии (рис. 3).

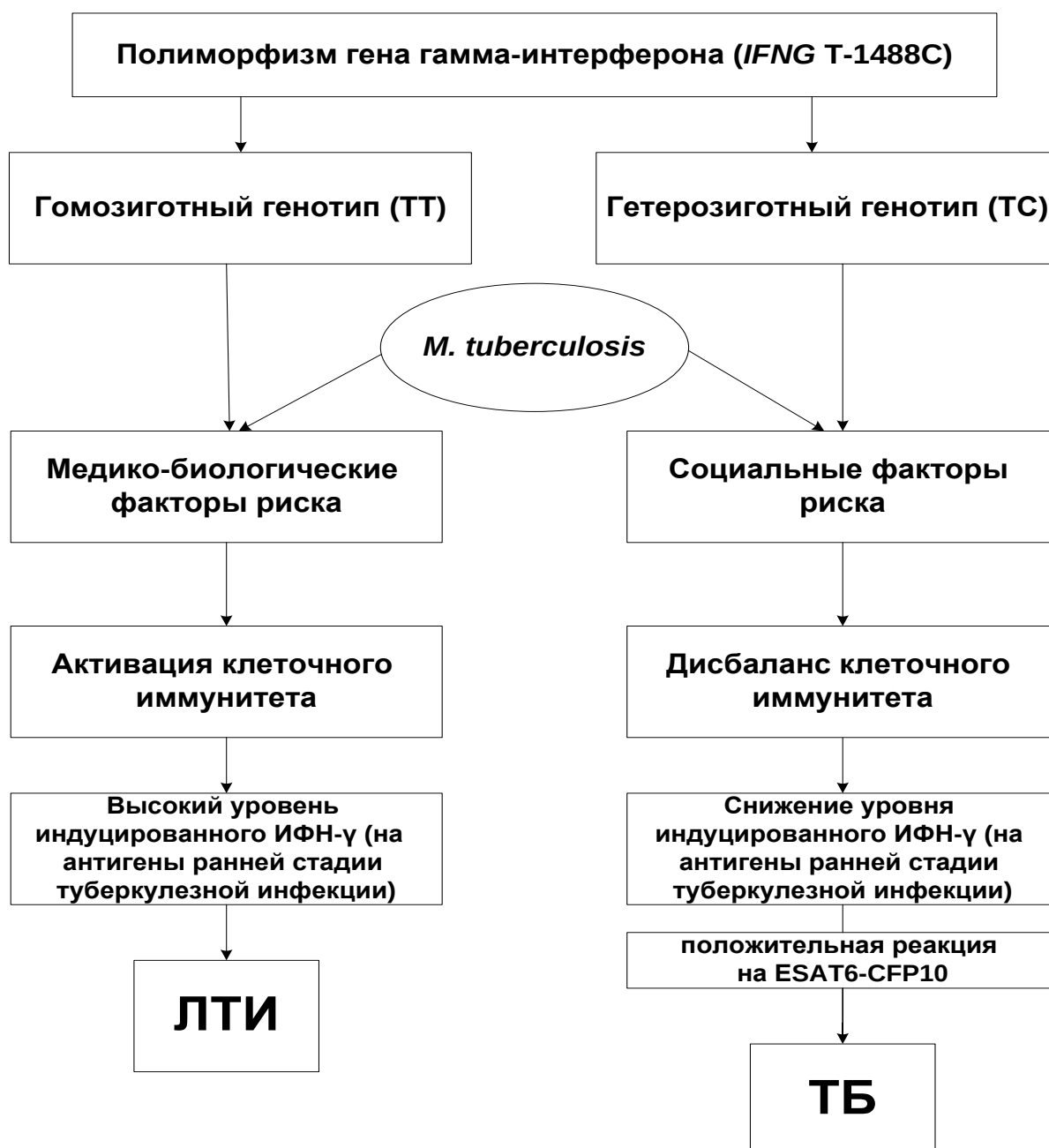


Рисунок 3 – Схема патогенеза прогрессирования туберкулезной инфекции

Известно, что до возникновения заболевания длительное время туберкулезная инфекция протекает бессимптомно и ее можно выявить только с помощью иммунологического анализа [M. Druszczyńska et al., 2017]. Основным недостатком в настоящее время является отсутствие золотого стандарта диагностики и прогнозирования заболевания [P. Auguste et al., 2017; WHO, 2018], т.к. ни один из иммунологических тестов не обладает достаточной чувствительностью или специфичностью для определения латентной и активной туберкулезной инфекции [WHO, 2018]. Поэтому приоритетной задачей исследований последнего времени

является поиск специфических биомаркеров для оценки всех этапов развития ТБ и возможности их использования в диагностических тестах [H. Su et al., 2017; D. Goletti et al., 2018]. С учетом этого задачей следующего этапа нашего исследования являлась оценка значимости туберкулезных антигенов (как хорошо изученных, так и недавно идентифицированных) на разных стадиях развития туберкулезной инфекции у детей.

Среди ранее изученных специфических белков МБТ в настоящее время для дальнейшего исследования представляет интерес ESAT6. Низкомолекулярный секретируемый белок ESAT6 [H. Yang et al., 2012] кодируется в регионе RD1, который присутствует в *M. tuberculosis* и *M. bovis*, но отсутствует в *M. bovis* BCG. Среди факторов, которые оказывают непосредственное воздействие на организм хозяина для подавления защитных механизмов, рассматривался именно белок ESAT6 [J. Dietrich et al., 2015]. По результатам других исследований, данный белок оценивался как рано секретируемый антиген на этапе формирования противотуберкулезного иммунитета, в экспериментах была доказана его протективная роль [J. S. Woodworth et al., 2014], и, как следствие, его можно было бы считать маркером ЛТИ. В нашем исследовании было доказано, что специфический белок ESAT6 необходимо рассматривать в качестве маркера ЛТИ на этапе ее раннего развития при первичном инфицировании МБТ. Так, положительные результаты индуцированного ИФН- γ с ESAT6 чаще регистрировались среди детей с ЛТИ, чем среди больных ТБ ($p = 0,05$). Сохранение ответа на ESAT6 на этапе развития ТБ свидетельствовало о благоприятном течении заболевания, что характерно было для первичных форм у детей. При этом, определяя уровень индуцированного ИФН- γ с ESAT6, установили значимые показатели для оценки РППТИ, индекс стимуляции составил $4,2 \pm 0,8$, для ТБ показатель был не значим – и.с. $1,1 \pm 0,1$ ($U = 4729$; $p = 0,000$).

Таким образом, полученные результаты показали, что белок ESAT6 значим для этапа раннего развития туберкулезной инфекции. Белок ESAT6 является одним из двух основных компонентов нового диагностического теста (T-SPOT.TB; Oxford Immunotec, UK) [H. Jia et al., 2016], зарегистрированного на территории РФ и рекомендованного в качестве альтернативного метода диагностики туберкулезной инфекции [Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению латентной туберкулезной инфекции у детей, 2015]. При этом последние исследования показали, что T-SPOT.TB не дифференцирует латентную и активную туберкулезную инфекцию [H. Jia et al., 2016;

F. Wang et al., 2016; K. L. Chin et al., 2017]. Второй белок, входящий в состав T-SPOT.TB, – CFP10. Мы в своем исследовании оценивали данные белки в виде гибрида – ESAT6-CFP10. Полученные результаты позволили нам говорить об изменении свойств белка ESAT6 в связанном с CFP10 состоянии и рассматривать данный гибрид для определения активной туберкулезной инфекции. Так, среди детей, больных ТБ, значимым был показатель уровня индуцированного ИФН- γ с ESAT6-CFP10 – и.с. $7,3 \pm 0,8$, для детей с ЛТИ показатель был не значим, в том числе на этапе первичного инфицирования МБТ (РППТИ) – и.с. $1,2 \pm 0,4$ ($U = 1291,5$; $p < 0,0001$) (рис. 4).

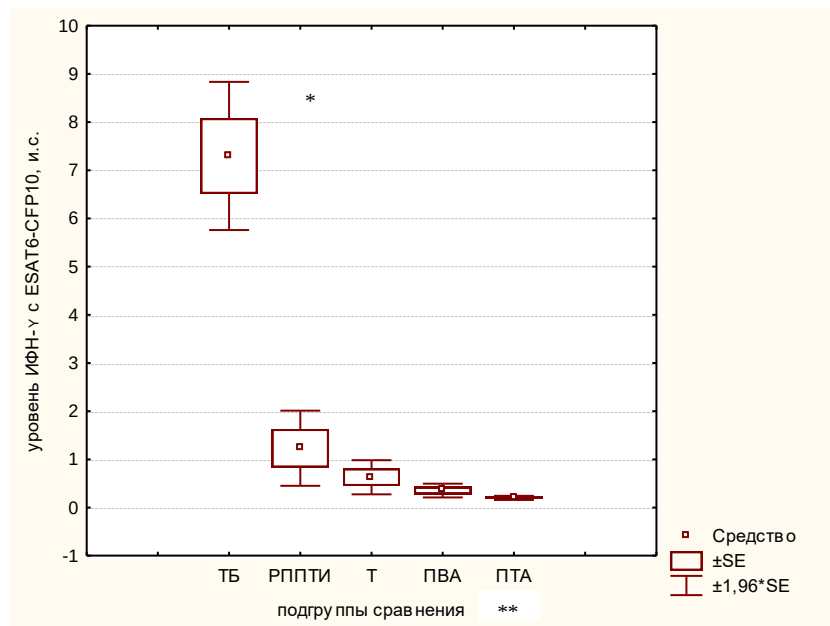


Рисунок 4 – Уровень индуцированного ИФН- γ с ESAT6-CFP10 у детей в группах сравнения (и.с.)

Примечание: * $p = 0,000$ (критерий Краскела-Уоллиса),

**группы сравнения: ТБ – группа с установленным диагнозом туберкулез; РППТИ – группа детей в раннем периоде первичной туберкулезной инфекции; Т – группа инфицированных МБТ более года; ПВА – группа с поствакцинальной аллергией; ПТА – группа с положительной туберкулиновой анергией.

Еще один хорошо изученный специфический белок – 85а – в настоящее время предлагается для применения с диагностической целью. Ранее исследования показали, что антигенный комплекс 85 проявляет высокую перекрестную реактивность с антигенами практически всех МБТ [A. Demissie et al., 2006], это позволяет говорить о его низкой диагностической информативности для ЛТИ. Полученные результаты нашего исследования показали, что Ag85а – это белок, характеризующий в первую очередь латентную стадию туберкулезной инфекции, так как показатель индуцированного ИФН- γ с Ag85а был значим для РППТИ – и.с. $3,0 \pm 0,6$ ($p = 0,0002$).

При этом несмотря на большую частоту регистрации положительных результатов у детей с РППТИ (49,2%) ($p = 0,0005$), выявили положительные показатели и у детей с ПВА (17,6%), что, как мы и предполагали, снижало значимость этого белка для дифференциальной диагностики туберкулезной инфекции у детей.

Среди недавно идентифицированных белков был выбран один из перспективных антигенов МБТ – белок Rv2660с, который относится к области RD11 МБТ [L. Govender et al., 2010]. Считается, что данный белок может относиться к латентным антигенам [A. M. Salman et al., 2017], хотя его функция в настоящее время до конца не определена [L. Govender et al., 2010]. Поэтому оценка возможности распознавания иммунными клетками белка Rv2660с на разных стадиях туберкулезной инфекции позволит расширить представление о новом антигене. Результаты нашего исследования впервые дают возможность говорить о белке Rv2660с как о маркере ранней стадии туберкулезной инфекции при первичном инфицировании МБТ. При определении уровня ИФН- γ после индукции Rv2660с у больных ТБ (и.с. $1,6 \pm 0,3$), у детей с ЛТИ (и.с. $3,4 \pm 0,5$) и у НТ (и.с. $1,0 \pm 0,2$) были установлены различия ($H = 10,826$; $p = 0,004$) (рис. 5).

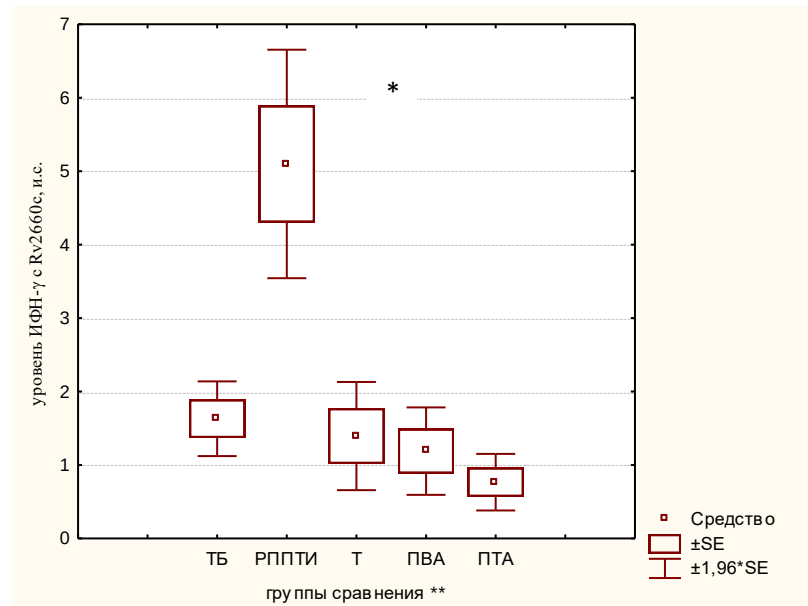


Рисунок 5 – Уровень индуцированного ИФН- γ с Rv2660с у детей в группах сравнения (и.с.)

Примечание: * $p = 0,000$ (критерий Краскела-Уоллиса)

**группы сравнения: ТБ – группа с установленным диагнозом туберкулез; РППТИ – группа детей в раннем периоде первичной туберкулезной инфекции; Т – группа инфицированных МБТ более года; ПВА – группа с поствакцинальной аллергией; ПТА – группа с положительной туберкулиновой анергией.

Сравнивая показатели ИФН- γ после индукции Rv2660с (и.с.) у детей, больных ТБ, в зависимости от генеза заболевания установили достоверные отличия ($U = 724,5$; $p = 0,031$) в продукции цитокина при формировании первичных (и.с. $1,9 \pm 0,3$) и вторичных форм (и.с. $0,8 \pm 0,2$), что указывало на протективную роль специфического белка. Наиболее высокий уровень цитокина после стимуляции Rv2660с выявили на этапе РППТИ – и.с. $5,1 \pm 0,8$ ($U = 4887$; $p = 0,000$). Также имелась сильная корреляция между показателями индуцированного ИФН- γ с ESAT6 и Rv2660с (по Спирмену, $r = 0,77$, $p = 0,000$). Таким образом, все это позволяет утверждать, что основная роль белка связана с ранней стадией развития туберкулезной инфекции и, следовательно, белок Rv2660с, так же как белок ESAT6, участвует в формировании адаптивного иммунитета. А, учитывая, что данные белки не связаны с поствакцинальным иммунитетом, ESAT6 и Rv2660с можно рассматривать в качестве основных антигенов для диагностики РППТИ.

Еще одним из недавно идентифицированных антигенов МБТ является белок CFP32В. Установлено, что данный белок стимулирует гуморальный ответ [R. C. Huard et al., 2003], поэтому можно предположить его роль в прогрессировании ТБ. При этом проводимые ранее исследования ограничены и противоречивы, что не позволяет оценить роль белка CFP32В на этапе развития туберкулезной инфекции, также необходимо учитывать, что ген данного белка обнаружен и в геноме БЦЖ [C. Benabdesselem et al., 2006]. По результатам наших исследований установлено, что для оценки активности туберкулезной инфекции и ее прогрессирования белок CFP32В мало значим. Дополнительно было установлено, что показатель значим у детей с РППТИ (и.с. $3,5 \pm 0,6$, $U = 4459,5$; $p = 0,000$). При этом ответ на CFP32В сохранялся при вакцинации БЦЖ или БЦЖ-М. Так как возможна перекрестная реакция с МБТ, это снижает диагностическую значимость специфического белка CFP32В. Таким образом, мы впервые идентифицировали белок CFP32В в качестве потенциального маркера для ЛТИ с невысокой диагностической значимостью.

Комплексная оценка специфических белков позволила выделить несколько вариантов иммунного ответа по результатам кластерного анализа (рис. 6): первый вариант (кластер 1) был связан с выраженным ответом на ППД-Л и ESAT6-CFP10, а также слабо выраженным ответом на белки ранней стадии туберкулезной инфекции (ESAT6, Rv2660с, 85а, CFP32В), второй (кластер 2) – с отсутствием ответа на

стимуляцию антигенами, третий (кластер 3) – с выраженным ответом на белки ранней стадии туберкулезной инфекции, слабо выраженным на ППД-Л и отсутствием ответа на гибридный белок.

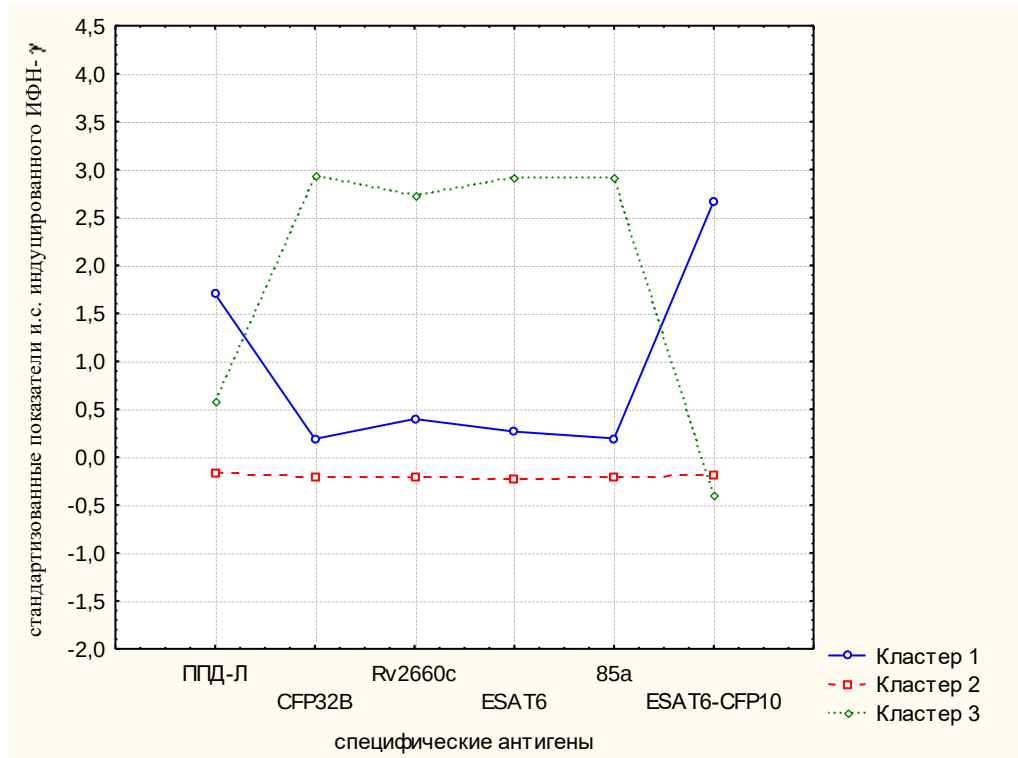


Рисунок 6 – Кластерный анализ по стандартизованным показателям и.с. индуцированного ИФН-γ специфическими антигенами у детей

Среди белков ранней стадии туберкулезной инфекции по результатам ранжирования для ЛТИ были установлены значимые уровни для Rv2660c – $R\ 3,984$; ESAT6 – $R\ 3,411$, CFP32B – $R\ 3,016$ и 85a – $R\ 2,958$. Для ТБ значимым, кроме туберкулина, был гибридный белок, при ранжировании для них установлены наибольшие значения среднего ранга $R\ 5,945$ и $R\ 4,573$ ($p < 0,000001$), при этом низкий уровень иммунного ответа на специфические белки рассматривался в качестве риска неблагоприятного течения заболевания (коэффициент риска 1,73; 95% ДИ 1,059–2,828). Вариант регистрации положительного ответа на ESAT6-CFP10 у детей с ЛТИ оценивали в качестве риска развития ТБ (коэффициент риска составил 4,047; 95% ДИ 2,797–5,856).

Таким образом, мы впервые установили, что белки ESAT6, Rv2660c, 85a и CFP32B можно рассматривать в качестве маркеров ЛТИ на ее ранней стадии развития, а гибридный белок ESAT6-CFP10 – маркера активной туберкулезной инфекции – преимущественно на стадии развития заболевания или высокого риска ТБ. Антигены ППД-Л, 85a, CFP32B менее значимы для решения вопросов дифференциальной

диагностики ЛТИ и ПБА, учитывая перекрестную реактивность между БЦЖ и МБТ. В связи с этим мы определили в качестве перспективных для оценки ЛТИ два антигена: ESAT6 и Rv2660с, для активной – ESAT6-CFP10, что позволило рекомендовать их для включения в специфические иммунологические тесты по определению индуцированного ИФН- γ для диагностики и дифференциальной диагностики латентной и активной туберкулезной инфекции у детей.

При определении индуцированного ИФН- γ мы предложили количественную оценку показателей для возможности использования данных при динамическом наблюдении. Впервые были определены значимые диагностические критерии по уровню (и.с.) индуцированного ИФН- γ специфическими антигенами (ППД-Л, ESAT6-CFP10, ESAT6, Rv2660с, 85а и CFP32В) для диагностики ПБА, ЛТИ и ТБ. Для ПБА (для детей раннего возраста) характерны показатели уровня ИФН- γ с ППД-Л до 4,0, результат мог сочетаться с положительным (более 1,0) ответом на стимуляцию CFP32В и 85а. Регистрация положительного (более 2,0) ответа на ESAT6 и/или Rv2660с исключала ПБА. Для диагностики ЛТИ были значимы: уровень индуцированного ИФН- γ с ППД-Л 4,0 и более, что могло сочетаться с положительными ответами на белки ранней стадии туберкулезной инфекции (ESAT6, Rv2660с, 85а, CFP32В). Для определения активной туберкулезной инфекции диагностическими являлись: уровень индуцированного ИФН- γ с ППД-Л более 19,0 и положительный (более 1,0) ответ на ESAT6-CFP10.

Известно, что чувствительность теста на туберкулезную инфекцию с использованием одного антигена редко превышает 80% [K. Weldingh, et al., 2005], при включении уже двух белков, как это установлено у T-SPOT.TB, чувствительность составляет более 90% (92,0–94,1%) [K. L. Chin et al., 2017]. По этой причине выбор нескольких антигенов для возможности объективной диагностики туберкулезной инфекции может повысить информативность специфического теста. Оценивая информативность теста в нашем исследовании по определению индуцированного ИФН- γ специфическими антигенами ППД-Л, ESAT6-CFP10, ESAT6, Rv2660с, 85а и CFP32В, мы установили его высокую чувствительность на уровне 98,33% (95% ДИ 91,14–99,71%) и специфичность – 100% (95% ДИ 85,13–100%).

Знания о биомаркерах имеют большое значение в диагностике туберкулезной инфекции, поэтому их оценка являлась приоритетом в нашем исследовании. Кроме

этого, в настоящее время для подтверждения и прогнозирования туберкулезной инфекции используются новые методы интеллектуального анализа данных с возможностью применения вычислительных систем – искусственного интеллекта [S. Pachange et al., 2015; P. Dande et al., 2016; T. Asha et al., 2017]. Это согласуется с принятой концепцией персонализированной медицины [Б. А. Кобринский, 2017], которая основана на комплексном анализе информации, включающей три аспекта: данные о геноме человека, информацию о кодируемых генами белках, состояние здоровья человека. Для реализации такого комплексного подхода при интеграции генетических и клинических данных (включая факторы риска, диагностические критерии на основании специфических маркеров) мы построили три модуля (для двух компьютерных программ с учетом двух диагностических этапов: педиатрического и фтизиатрического) для определения риска развития ТБ у детей с использованием теоремы Байеса и алгоритм персонифицированной диагностики туберкулезной инфекции у детей. Созданные компьютерные программы позволяют индивидуально для каждого ребенка рассчитать риск и прогнозирование развития ТБ в процентном соотношении (на основании изменения данных основных переменных), что способствует более дифференцированному подходу к профилактике заболевания. Риск ЛТИ у детей на педиатрическом этапе был рассчитан исходя из операционных характеристик разработанных тестов и расценивался как высокий при показателе более 15%. Риск РППТИ у детей на фтизиатрическом этапе расценивался как высокий, если был более 33%, а риск развития ТБ у детей с ЛТИ – более 50%.

По первому модулю мы установили высокий относительный риск (RR 65,442; 95% ДИ 4,177–1025,201) развития ЛТИ (с учетом ранее установленных основных медико-биологических факторов риска ЛТИ и положительных результатов специфических иммунологических тестов *in vitro* с ППД-Л) у детей в случае превышения порога рискованного значения. Данный байесовский модуль был реализован в компьютерной программе «Выявление туберкулезной инфекции у детей» для обработки поступающей информации о пациентах с подозрением на туберкулезную инфекцию и определения риска ЛТИ, а также был использован в алгоритме для педиатрического этапа выявления инфекции (рис. 7).

По второму модулю мы установили высокий риск РППТИ (RR4,160; 95% ДИ 2,333–7,416) у детей при дополнительном, помимо медико-биологических факторов

риска, определении уровня индуцированного ИФН- γ после стимуляции специфическими антигенами: ППД-Л, CFP32В, Rv2660с, ESAT6, 85а, ESAT6-CFP10 (при установленных положительных результатах на стимуляцию белками ранней стадии туберкулезной инфекции и отрицательном результате на гибридный белок). Данный модуль был реализован в программе «Ранняя диагностика туберкулезной инфекции у детей» на ее I этапе. По третьему модулю на II фтизиатрическом этапе вычисляли вероятность наличия высокого риска ТБ у детей, где помимо ранее установленных факторов риска заболевания (социальных и медико-биологических) и определении уровня индуцированного ИФН- γ после стимуляции специфическими антигенами: ППД-Л, CFP32В, Rv2660с, ESAT6, 85а, ESAT6-CFP10 (установленного положительного результата на гибридный белок), определяли полиморфизм генов *IFNG* и *MCP1* (при регистрации гетерозиготных генотипов) и установили высокий относительный риск развития ТБ у детей в случае превышения порога рискованного значения (RR 10,718; 95% ДИ 4,207-27,303). Модули программы «Ранняя диагностика туберкулезной инфекции у детей» были использованы в алгоритме для фтизиатрического этапа диагностики (рис. 7).

Разработанный «Алгоритм персонифицированной диагностики туберкулезной инфекции у детей» на педиатрическом этапе в условиях общей лечебной сети, по нашему мнению, позволяет решить вопрос необходимости дальнейшего обследования в условиях специализированного учреждения, диагностическая эффективность данного этапа была рассчитана и составила 98%.

Фтизиатрический этап нашего алгоритма (специализированный) предусматривал объем обследования для оценки РППТИ среди детей с риском ЛТИ для решения вопроса ведения данной категории пациентов в условиях противотуберкулезного учреждения, рассчитанная диагностическая эффективность данного этапа составила 80,4%. Также фтизиатрический этап предусматривал обследование детей в РППТИ для оценки риска развития ТБ и диагностические мероприятия для исключения заболевания, диагностическая эффективность данного этапа была установлена на уровне 95,1%.

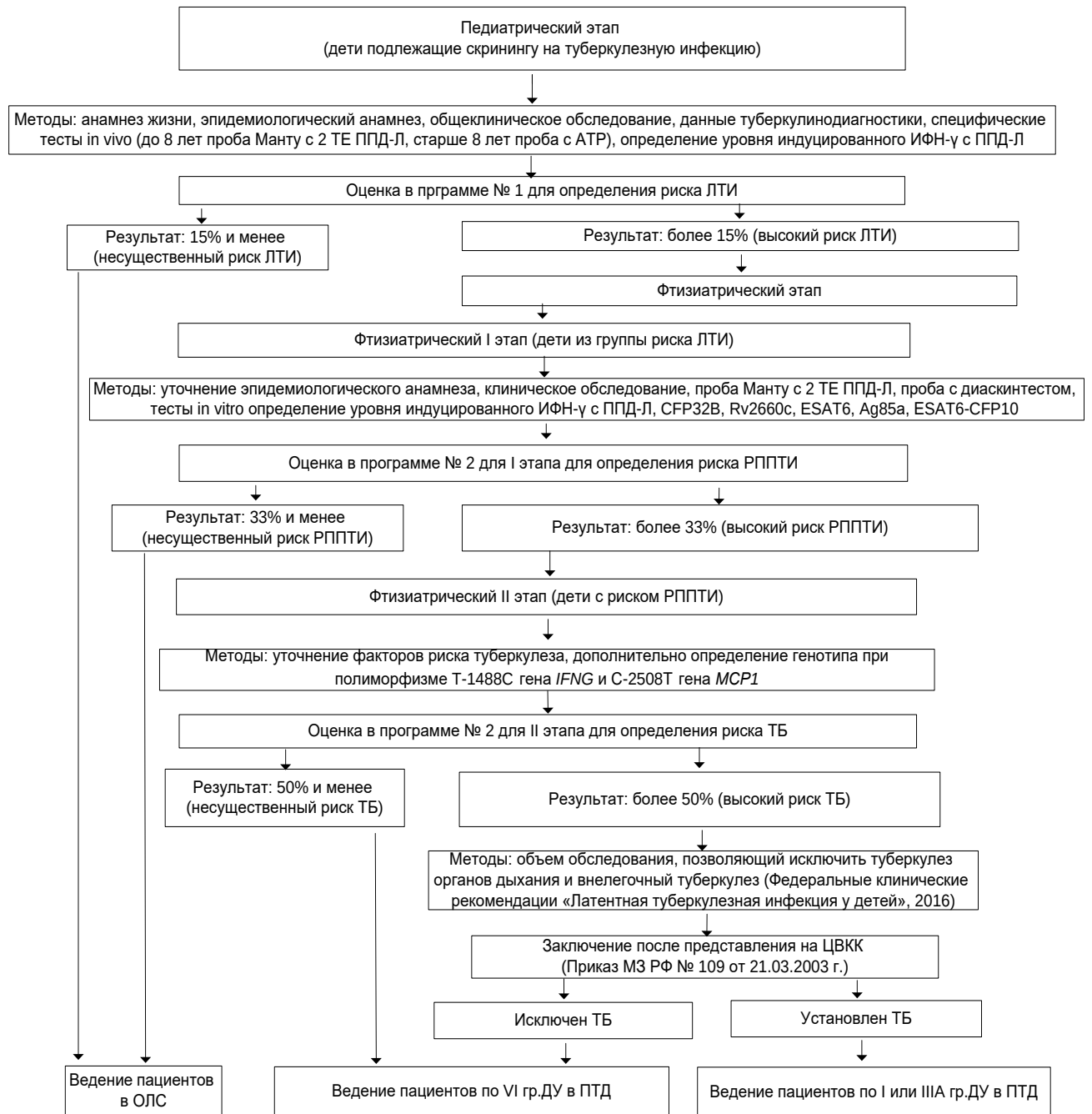


Рисунок 7 – Схема «Алгоритма персонифицированной диагностики туберкулезной инфекции у детей»

Таким образом, необходимость поиска новых биомаркеров для выявления туберкулезной инфекции и оценки прогностических критериев ее прогрессирования у детей позволила нам получить новый инструмент для диагностики ТБ и разработать «Алгоритм персонифицированной диагностики туберкулезной инфекции у детей» с достаточно высоким уровнем диагностической эффективности, что даёт возможность рекомендовать его как на педиатрическом этапе в условиях общей лечебной сети, так и на фтизиатрическом этапе в условиях специализированного учреждения.

ВЫВОДЫ

1. Основными предикторами для развития ЛТИ являются медико-биологические факторы, для ее прогрессирования – социальные:

- для ЛТИ значимы такие медико-биологические факторы: перенесенная ветряная оспа (риск выше в 3 раза), нарушение календаря профилактических прививок (в 3 раза), отягощенный аллергологический анамнез (в 1,5 раза), заболевания органов дыхания (в 3 раза), частые ОРВИ (в 1,5 раза);

- для ТБ значим отягощенный социальный анамнез (увеличение риска в 3-34 раза), курение в семье (в 2 раза), отсутствие организации ребенка (в 1,5 раза) с учетом эпидемиологических факторов (в 3-8 раз), отягощенной наследственностью по ТБ (в 8 раз), а также медико-биологических факторов (искусственное вскармливание, недоношенность, при рождении низкая масса тела (до 2500 г) с задержкой физического и нервно-психического развития к году), которые увеличивают риск в 2 раза.

2. Клиническими особенностями туберкулезной инфекции являются:

- при ЛТИ чаще выявляют очаги хронической инфекции (18,6%, $p = 0,027$), аллергические заболевания верхних и нижних дыхательных путей (15,4%, $p = 0,000008$) и избыточную массу тела (10,3%, $p = 0,044$);

- при ТБ – проявления интоксикационного и бронхолегочного синдромов, а также такие клинические симптомы как гепатоспленомегалия и дефицит массы тела, по данным лабораторного исследования крови – анемия, повышение СОЭ, лимфоцитоз и эозинофилия.

3. Иммунологическими особенностями туберкулезной инфекции являются:

- при развитии ЛТИ – активация клеточного ответа за счет повышения количества клеток с рецепторами CD3, CD4, CD8 и уровня спонтанного ИФН- γ (пг/мл);

- при ТБ – недостаточная продукция ИФН- γ : синтез ИФН- γ на уровне, характерном для ЛТИ, при сохраняющемся высоком уровне активированных Т-клеток, сниженном количестве NK-клеток, высоком уровне синтеза IgE и сниженной фагоцитарной активности клеток.

4. Маркером высокого риска развития ТБ как при первичном, так и вторичном по генезу варианту заболевания и его неблагоприятного течения является гетерозиготный генотип полиморфизма T-1488C гена *IFNG* с вероятным риском прогрессирования

заболевания на уровне 74,07%. Гетерозиготный генотип полиморфного варианта T-1488C гена *IFNG* ассоциирован с преимущественно правосторонним, распространенным специфическим поражением легких, с признаками деструкции легочной ткани и диссеминации, а также плеврита и бактериовыделением МБТ, с клиническими проявлениями ТБ в виде параспецифических реакций с развитием периферической лимфаденопатии, гепатоспленомегалии, дефицитом массы тела, анемией и повышением уровня СОЭ.

5. Выявлена связь гетерозиготного генотипа T-1488C гена *IFNG* с низкой массой тела при рождении (до 2500 г) (F92,515; $p = 0,000$), с отягощенным наследственным анамнезом по ТБ (F30,865; $p = 0,000$), с отсутствием грудного вскармливания (F8,31; $p = 0,000001$), с формированием низкой результативности вакцинации БЦЖ (БЦЖ-М) (F4,946; $p = 0,004$). При развитии ТБ гетерозиготный генотип полиморфного варианта T-1488C гена *IFNG* связан с ведущими факторами в реализации высокого риска заболевания – низким достатком в семье (F31,994; $p = 0,0000$), отсутствием грудного вскармливания (F6,965; $p = 0,0004$) и курением в семье (F5,193; $p = 0,003$), что позволяет данные факторы риска отнести к внешним факторам, влияющим на эпигенетические модификации генома.

6. Впервые определено, что полиморфизм гена *IFNG* (T-1488C) ассоциирован с различной выраженностью иммунного ответа против отдельных МБТ-антигенов: наличие гомозиготного генотипа по аллелю Т ассоциируется с высоким уровнем продукции ИФН- γ после специфической стимуляции у детей с ЛТИ, гетерозиготный генотип связан с низким уровнем индуцированного ИФН- γ у детей, больных ТБ.

7. При развитии ТБ гетерозиготный генотип полиморфизма C-2508T гена *MCP1* связан с прогрессированием заболевания с вероятным риском 76,54%.

8. Маркером ЛТИ на ее ранней стадии развития являются специфические белки: ESAT6, Rv2660c, 85a и CFP32B. Гибридный белок ESAT6-CFP10 определен как маркер активной туберкулезной инфекции, преимущественно на стадии развития заболевания или высокого риска ТБ.

9. Значимыми диагностическими критериями по уровню (и.с.) индуцированного ИФН- γ специфическими антигенами (ППД-Л, ESAT6-CFP10, ESAT6, Rv2660c, 85a и CFP32B) являются: для ПВА (у детей до трех лет) – показатели уровня ИФН- γ с ППД-Л до 4,0 и положительные ответы на стимуляцию CFP32B и/или 85a (при положительном

ответе на ESAT6 и Rv2660с, исключается ПБА), для ЛТИ – уровень ИФН- γ с ППД-Л 4,0 и более, положительные ответы на белки ранней стадии туберкулезной инфекции (и/или ESAT6, Rv2660с, 85a, CFP32B), для активной туберкулезной инфекции – уровень ИФН- γ с ППД-Л более 19,0 и/или положительный ответ на ESAT6-CFP10.

10. Разработаны программы ЭВМ для ранней диагностики туберкулезной инфекции с оценкой высокого относительного риска для ЛТИ (по программе «Выявление туберкулезной инфекции у детей» (RR 65,442) на педиатрическом этапе и по I этапу программы «Ранняя диагностика туберкулезной инфекции у детей» (RR4,160) на фтизиатрическом этапе) и для ТБ (по II этапу программы «Ранняя диагностика туберкулезной инфекции у детей» (RR10,718).

11. Установлена высокая диагностическая эффективность разработанного «Алгоритма персонифицированной диагностики туберкулезной инфекции у детей» для педиатрического этапа на уровне 98%, для фтизиатрического – 95,1%.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для предупреждения развития ЛТИ рекомендовать проведение профилактических мероприятий в антенатальном, интранатальном и раннем постнатальном периодах. Для снижения риска дополнительно рекомендовать сохранение грудного вскармливания, иммунизацию по календарю профилактических прививок, включая вакцинацию против ветряной оспы, санацию хронических очагов инфекции, профилактику аллергических заболеваний и респираторных вирусных инфекций.

2. Специфические белки ESAT6-CFP10, ESAT6, Rv2660с, 85a, CFP32B и ППД-Л рекомендовать для разработки комплексной диагностической тест-системы (для ранней диагностики и дифференциальной диагностики туберкулезной инфекции у детей).

3. Детям в РППТИ рекомендовать проведение молекулярно-генетического исследования для исключения высокого риска ТБ (при регистрации гетерозиготного генотипа полиморфного варианта гена *IFNG* (T-1488C).

4. Детей с положительными реакциями при определении индуцированного специфическими антигенами ИФН- γ и регистрации гетерозиготного генотипа полиморфного варианта гена *IFNG* (T-1488C) рассматривать как группу высокого риска ТБ, что предусматривает комплексное, включая МСКТ ОГК, обследование для

исключения или подтверждения заболевания, а также проведения профилактических мероприятий по предупреждению развития ТБ в условиях санаторного или специализированного стационарного учреждения.

5. При выявлении у детей ТБ рекомендовать проведение молекулярно-генетического исследования для исключения высокого риска прогрессирования заболевания (при регистрации гетерозиготного генотипа полиморфного варианта гена *IFNG* (Т-1488С) или гена *MCP1* (С-2508Т).

6. Детей, проживающих в семьях социального риска, рассматривать как группу высокого риска по ТБ даже при отсутствии возможности установления контакта с больным ТБ. Для снижения рисков развития ТБ рекомендовать мероприятия по предупреждению социальных рисков.

7. Рекомендовать внедрение «Алгоритма персонифицированной диагностики туберкулезной инфекции у детей» как на этапе выявления туберкулезной инфекции у детей – в практике врача педиатра общей лечебной сети, – так и ее диагностики – в практике врача фтизиатра в условиях противотуберкулезных учреждений.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Плеханова, М. А.** Проба Манту с 2 ТЕ ППД-Л и/или проба с Диаскинтестом? / **М. А. Плеханова** // Сборник материалов XVII Конгресса педиатров России с международным участием «Актуальные проблемы педиатрии». – Москва, 2014. – Ст. 259.
2. **Плеханова, М. А.** Основные проблемы туберкулезной инфекции у детей Омской области / **М. А. Плеханова** // Туберкулез и социально значимые заболевания. – 2014. – № 1-2. – С. 126-127.
3. **Плеханова, М. А.** Решение социально-психологических проблем детей, больных туберкулезом / **М. А. Плеханова, Е. А. Мерко** // Материалы VIII Российского форума с международным участием «Здоровье детей: профилактика и терапия социально-значимых заболеваний. – Санкт-Петербург, 2014. – С. 206-210.
4. Формирование мотивации к здоровому образу жизни у подростков / **М. А. Плеханова, С. С. Зюзько, И. Н. Масленикова, Г. Н. Иванова, Т. В. Крупина** // Туберкулез и болезни легких. – 2014. – № 8. – С. 41-43.

5. **Плеханова, М. А.** Состояние вопроса о туберкулезной инфекции у детей и подростков на фоне изменения эпидемической ситуации / **М. А. Плеханова** // **Туберкулез и болезни легких.** – 2014. – № 8. – С. 83-85.
6. Роль родителей в профилактике туберкулеза / **М. А. Плеханова**, Е. А. Хатинова, С. В. Андреева, В. Е. Дмитриева, Л. Р. Дружинина // **Туберкулез и болезни легких.** – 2014. – № 8. – С. 109-111.
7. **Плеханова, М. А.** Оптимизация выявления и ранней диагностики туберкулезной инфекции у детей / **М. А. Плеханова** // Труды Международного форума «Клиническая иммунология и аллергология – междисциплинарные проблемы». – Казань, 2014. – С. 203-205.
8. Эффективность и безопасность противотуберкулезной вакцинации / О. А. Пасечник, **М. А. Плеханова**, Е. А. Цыганкова, Т. А. Шахова // **Эпидемиология и вакцинопрофилактика.** – 2014. – № 6 (79). – С. 83-89.
9. **Плеханова, М. А.** Эпидемиологический надзор за безопасностью противотуберкулезной вакцинации / **М. А. Плеханова**, О. А. Пасечник // Сборник тезисов III Конгресса национальной ассоциации фтизиатров. – Санкт-Петербург, 2014. – № 28. – С. 45.
10. **Плеханова, М. А.** Новые подходы к диагностике латентной туберкулезной инфекции у детей / **М. А. Плеханова**, В. А. Аксенова, Л. А. Кривцова // Сборник материалов XVIII конгресса педиатров России с международным участием «Актуальные проблемы педиатрии». – Москва, 2015. – С. 189.
11. Роль белка M. tuberculosis Rv2660c при оценке латентной туберкулезной инфекции / **М. А. Плеханова**, В. А. Аксенова, Ю. И. Пацула, Л. А. Кривцова, А. П. Ткачук, В. Г. Лунин, А. Н. Коломеец, Е. А. Мерко // **Туберкулез и болезни легких.** – 2015. – № 5. – С. 144-145.
12. Значение белка Rv0577 для ранней диагностики туберкулезной инфекции / **М. А. Плеханова**, В. А. Аксенова, Ю. И. Пацула, Л. А. Кривцова, А. П. Ткачук, В. Г. Лунин, А. Н. Коломеец // **Российский иммунологический журнал.** – 2015. – Т. 9 (18), № 2 (1). – С. 145-147.
13. **Плеханова, М. А.** Безопасность противотуберкулезной вакцинации / **М. А. Плеханова**, О. А. Пасечник // **Туберкулез и болезни легких.** – 2015. – № 5. – С. 148-149.

14. Новое в диагностике латентной туберкулезной инфекции у детей / **М. А. Плеханова**, В. А. Аксенова, Ю. И. Пацула, Л. А. Кривцова, А. П. Ткачук, В. Г. Лунин, А. Н. Коломеец, Е. А. Мерко // Материалы IV Конгресса Национальной Ассоциации фтизиатров, Санкт-Петербург, 19-21.11.15. – Санкт-Петербург, 2015. – С. 220-222.
15. Полиморфные варианты генов IFNG и MCP1 и их вклад в развитие туберкулеза у детей / **М. А. Плеханова**, Ю. И. Пацула, А. Н. Коломеец, А. П. Ткачук, В. А. Аксенова, Л. А. Кривцова, Е. С. Довгополок // **Российский иммунологический журнал**. – 2016. – Т. 10 (19), № 4. – С. 478-480.
16. Исследование антиген-специфической продукции ИФН-γ при полиморфизме T-1488C гена IFNG у детей с латентной туберкулезной инфекцией / **М. А. Плеханова**, Ю. И. Пацула, А. Н. Коломеец, А. П. Ткачук, В. А. Аксенова, Л. А. Кривцова, Е. С. Довгополок // **Российский иммунологический журнал**. – 2016. – Т. 10 (19), № 4. – С. 481-483.
17. Оценка значимости полиморфизма T-1488C гена IFNG при развитии туберкулеза у детей / **М. А. Плеханова**, Л. А. Кривцова, А. Н. Дакуко, Т. А. Гончарова, Т. Н. Белкова, Т. В. Оксеньчук // Избранные вопросы педиатрии, детской хирургии, анестезиологии и реанимации : сборник научных трудов. Посвящается 80-летию бюджетного учреждения здравоохранения Омской области "Областная детская клиническая больница". – Омск, 2016. – С. 72-76.
18. **Патент на изобретение № 2586279**, Российская Федерация G01N 33/535 (2006.01). Способ оценки активности туберкулезной инфекции у детей и подростков / **Плеханова М. А.**, Пацула Ю. И., Аксенова В. А., Кривцова Л. А., Лунин В. Г., Ткачук А. П., Гинцбург А. Л. ; патентообладатель ФГБУ "ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи" Минздрава России. – 2015124784/15, заявл. 24.06.2015, **опубл. 10.06.2016, Бюл. № 16.** – 10 стр.
19. Новые возможности в ранней диагностике туберкулезной инфекции у детей Омской области [Электронный ресурс] / **М. А. Плеханова**, Л. А. Кривцова, Т. Н. Белкова, А. Н. Дакуко, Т. В. Оксеньчук, Т. А. Гончарова // **Современные проблемы науки и образования**. – 2016. – № 6. – URL: <http://www.science-education.ru/article/view?id=25797>.

20. **Программа для ЭВМ № 2017610590**, Российская Федерация. Ранняя диагностика туберкулезной инфекции у детей [Электронный ресурс] / **Плеханова М. А.**, Кривцова Л. А., Аксенова В. А., Пацула Ю. И., Коломеец А. Н., Ткачук А. П., Довгополюк Е. С.; правообладатели Плеханова М. А., Кривцова Л. А. – 2016662869, заявл. **15.11.2016**, опубл. **13.01.17**.
URL:http://www1.fips.ru/wps/PA_FipsPub/res/Doc/PrEVM/RUNWPR/000/002/017/610/590/2017610590-00001/DOCUMENT.PDF.
21. **Программа для ЭВМ № 2017610653**, Российская Федерация. Выявление туберкулезной инфекции у детей [Электронный ресурс] / **Плеханова М. А.**, Кривцова Л. А., Аксенова В. А., Пацула Ю. И., Коломеец А. Н., Ткачук А. П., Довгополюк Е. С.; правообладатели **Плеханова М. А.**, Кривцова Л. А. – 2016662649, заявл. **15.11.2016**, опубл. **16.01.17**.
URL:http://www1.fips.ru/wps/PA_FipsPub/res/Doc/PrEVM/RUNWPR/000/002/017/610/653/2017610653-00001/DOCUMENT.PDF.
22. Оценка специфических антигенов ранней стадии туберкулезной инфекции у детей / **М. А. Плеханова**, В. А. Аксенова, А. П. Ткачук, Ю. И. Пацула, Л. А. Кривцова, А. Н. Коломеец // **Туберкулёз и болезни лёгких**. – 2017. – Т. 95, № 1. – С. 27-33.
23. Индивидуализация методов профилактики туберкулеза у детей Омской области [Электронный ресурс] / **М. А. Плеханова**, Л. А. Кривцова, Т. Н. Белкова, А. Н. Дакуко, Т. В. Оксеньчук, Т. А. Гончарова // **Современные проблемы науки и образования**. – 2017. – № 6. – URL: <http://www.science-education.ru/article/view?id=27159>.
24. **Плеханова, М. А.** Влияние специфических белков микобактерии туберкулеза на иммунный ответ у детей / **М. А. Плеханова** // **Вопросы практической педиатрии**. – 2017. – Т. 12, № 3. – С. 19-25.
25. **Плеханова, М. А.** Адаптивный иммунитет и генетические аспекты прогрессирования туберкулезной инфекции у детей / **М. А. Плеханова** // **Вестник РГМУ**. – 2017. – № 5. – С. 38–44.
26. Плеханова, М. А. Иммунологические методы *in vitro* в диагностике туберкулеза у детей / М. А. Плеханова, Л. А. Кривцова, Л. А. Кудряшова // Сборник тезисов XVIII Съезда педиатров России. – Москва, 2017. – Ст. 234.

27. Плеханова, М. А. Оценка генетических факторов в развитии туберкулеза у детей / **М. А. Плеханова**, Л. А. Кривцова, Е. А. Мерко // Сборник тезисов XVIII Съезда педиатров России. – Москва, 2017. – Ст. 233.
28. **База данных № 2017620361**, Российская Федерация. Молекулярно-генетические предикторы туберкулезной инфекции у детей [Электронный ресурс] / **Плеханова М. А.**, Кривцова Л. А.; правообладатель ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России. – 2017620040, заявл. 10.01.2017, опубл. 03.04.2017. – URL: http://www1.fips.ru/fips_servl/fips_servlet?DB=DB&rn=%201300&DocNumber=2017620361&TypeFile=html.
29. **Плеханова, М. А.** Нерешенные вопросы ранней диагностики туберкулезной инфекции у детей / **М. А. Плеханова**, В. А. Аксенова, Л. А. Кривцова // Материалы VI Конгресса Национальной Ассоциации фтизиатров. – Санкт-Петербург, 2017. – С. 183.
30. **Плеханова, М. А.** Стратификация риска при туберкулезной инфекции у детей / М. А. Плеханова, Л. П. Елгина, Е. А. Мерко // Материалы VI Конгресса Национальной Ассоциации фтизиатров. – Санкт-Петербург, 2017. – С. 184.
31. **Плеханова, М. А.** Генетический полиморфизм и особенности адаптивного иммунитета у детей с туберкулезной инфекцией / **М. А. Плеханова**, В. А. Аксенова, Л. А. Кривцова // Материалы VI Конгресса Национальной Ассоциации фтизиатров. – Санкт-Петербург, 2017. – С. 186.
32. **Plekhanova MA** Adaptive immunity and genetic aspects of tuberculosis in children. **Bulletin of RSMU**. 2017; 5: 34-40.
33. **Плеханова, М. А.** Предикторы развития туберкулеза у детей / **М. А. Плеханова** // Сборник материалов XX конгресса педиатров России с международным участием «Актуальные проблемы педиатрии». – Москва, 2018. – С. 252.
34. **Плеханова, М. А.** Риск развития туберкулеза при полиморфизме гена *IFNG* у детей / **М. А. Плеханова**, В. А. Аксенова, Л. А. Кривцова // Тезисы VI Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы профилактики, диагностики и лечения туберкулеза у детей и подростков». – Сочи, 2018. – http://www.humanhealth.ru/images/conference/29-31_03_2018_Sochi/Tezisy/45.pdf.
35. Значимость гена *IFNG* при развитии туберкулеза у детей / **М. А. Плеханова**, Л. А. Кривцова, Е. А. Мерко, Л. А. Кудряшова // Сборник материалов Межрегиональной

научно-практической конференции «Актуальные вопросы оказания медицинской и социальной помощи детям, оставшимся без попечения родителей и находящимся в трудной жизненной ситуации в доме ребенка», посвященная 100-летию КУЗОО "Специализированный дом ребенка". – Омск, 2018. – С. 232-234.

36. **Плеханова, М. А.** Генетические предикторы прогрессирования туберкулезной инфекции у детей / **М. А. Плеханова** // **Инфекционные болезни.** – 2018. – Т. 16, № 2. – С. 49-53.