

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «ОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

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

Диссертация
на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Научные консультанты:
доктор медицинских наук, профессор
Кривцова Людмила Алексеевна,
доктор медицинских наук, профессор
Аксенова Валентина Александровна

Омск – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1. Латентная туберкулезная инфекция	15
1.2. Иммунопатогенез и иммуногенетика туберкулезной инфекции	24
1.3. Методы выявления и диагностики ЛТИ (Специфические антигены) ...	41
Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	51
2.1. Дизайн исследования, критерии включения и исключения из исследования	51
2.2. Клиническая характеристика детей, включенных в исследование	55
2.3. Методы исследования	63
2.4. Статистические методы исследования	65
Глава 3. ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ ЛАТЕНТНОЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ И ФАКТОРЫ ЕЕ ПРОГРЕССИРОВАНИЯ У ДЕТЕЙ	68
3.1. Особенности социального анамнеза при развитии ЛТИ и ее прогрессировании у детей	68
3.2. Особенности биологического анамнеза при развитии ЛТИ и ее прогрессировании у детей	70
3.3. Особенности эпидемиологического анамнеза при развитии ЛТИ и ее прогрессировании у детей	77
3.4. Стратификация рисков туберкулезной инфекции у детей	78
Глава 4. КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЛАТЕНТНОЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ И ПРИ ЕЕ ПРОГРЕССИРОВАНИИ У ДЕТЕЙ	83
4.1. Результаты клинического обследования детей в период ЛТИ и при ее прогрессировании	83
4.2. Результаты иммунологического обследования детей в период ЛТИ и при ее прогрессировании	84
Глава 5. ЗНАЧЕНИЕ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА <i>IFNG</i> (T- 1488C) И ГЕНА <i>MSPI</i> (C-2508T) ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ	88

5.1. Частота полиморфного варианта гена <i>IFNG</i> (T-1488C) у детей больных туберкулезом	88
5.2. Значение полиморфного варианта гена <i>IFNG</i> (T-1488C) в предрасположенности к развитию туберкулеза у детей	90
5.3. Клиническое значение полиморфного варианта гена <i>IFNG</i> (T-1488C) у детей больных туберкулезом	92
5.4. Значение полиморфного варианта гена <i>IFNG</i> (T-1488C) среди детей с латентной туберкулезной инфекцией	96
5.5. Полиморфный вариант гена <i>IFNG</i> (T-1488C) и результативность вакцинации БЦЖ или БЦЖ-М среди детей с ЛТИ	98
5.6. Значение полиморфного варианта гена <i>MCP1</i> (C-2508T) в предрасположенности к прогрессированию специфического процесса у детей	100
5.7. Значение полиморфного варианта гена <i>IFNG</i> (T-1488C) для уровня ИФН- γ у детей исследуемых групп	103
Глава 6. ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ БЕЛКОВ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ	109
6.1. Оценка уровня ИФН- γ , индуцированного ППД-Л, и его значимость при развитии туберкулезной инфекции у детей	110
6.2. Оценка уровня индуцированного ИФН- γ с ESAT6-CFP10 и его значимость при развитии туберкулезной инфекции у детей	114
6.3. Оценка уровня индуцированного ИФН- γ белками ранней стадии туберкулезной инфекции (ESAT6, 85a) и их значимость при развитии специфического процесса у детей	118
6.4. Оценка уровня индуцированного ИФН- γ с CFP32B и его значимость при развитии туберкулезной инфекции у детей	127
6.5. Оценка уровня индуцированного ИФН- γ с Rv2660c и его значимость при развитии туберкулезной инфекции у детей	130
6.6. Комплексная оценка специфических белков на разных этапах развития туберкулезной инфекции у детей	135

6.7. Иммунодиагностика туберкулезной инфекции у детей в тестах <i>in vitro</i>	142
6.7.1. Оценка информативности специфического иммунологического исследования <i>in vitro</i> : определение уровня индуцированного ИФН- γ с ППД-Л и ESAT6-CFP10 при развитии туберкулезной инфекции у детей	143
6.7.2. Оценка информативности специфического иммунологического исследования <i>in vitro</i> : определение уровня индуцированного ИФН- γ с ESAT6 и Rv2660c при развитии туберкулезной инфекции у детей	147
6.7.3. Оценка информативности специфического иммунологического исследования <i>in vitro</i> : определение уровня индуцированного ИФН- γ с CFP32B и Ag85a при развитии туберкулезной инфекции у детей	148
6.7.4. Комплексная оценка информативности специфического иммунологического исследования <i>in vitro</i> : определение уровня индуцированного ИФН- γ специфическими антигенами при развитии туберкулезной инфекции у детей	149
Глава 7. АЛГОРИТМ ПЕРСОНИФИЦИРОВАННОЙ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ: РАЗРАБОТКА И ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ	154
7.1. Оценка диагностической эффективности модуля программы № 1 «Выявление туберкулезной инфекции у детей»	154
7.2. Оценка диагностической эффективности модулей программы № 2 «Ранняя диагностика туберкулезной инфекции у детей»	160
7.3. Алгоритм персонифицированной диагностики туберкулезной инфекции у детей	169
Глава 8. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	175
ВЫВОДЫ	196
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	199
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	201
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	203
ПРИЛОЖЕНИЯ	256

ВВЕДЕНИЕ

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) [448]. По оценкам экспертов ВОЗ, около одной четверти населения мира имеют латентный ТБ, в том числе и дети [257]. 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 [257], которое чаще 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 [263; 429]. 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 [429; 458].

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 [448]. 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 году [308]. При этом факторы, способствующие прогрессированию от ЛТИ до ТБ, в настоящее время полностью не изучены [316], а существующие методы выявления и диагностики туберкулезной инфекции у детей не позволяют дифференцировать латентную от активной [179; 315; 467].

В настоящее время идет активный поиск инструментов (биомаркеров ЛТИ) для ранней диагностики и прогнозирования развития активной туберкулезной инфекции [355; 467]. При этом в условиях перехода к персонифицированной медицине исследования должны учитывать и молекулярно-генетические маркеры, влияющие на развитие и прогрессирование ТБ [49].

Анализ протеома *M. tuberculosis* [178] позволил выявить не менее 1800 клеточных и 800 секретиромых белков, перспективных для создания новых вакцин и диагностических тестов [177]. Однако идентификация таких потенциальных антигенов представляет собой непростую задачу, поскольку, с одной стороны, все еще отсутствуют точные данные о полном спектре секретиромых 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 [311]. Данная проблема обусловлена еще тем, что до конца не раскрыты механизмы прогрессирования туберкулезной инфекции [430]. Считается, что в защите от ТБ немаловажная роль принадлежит генетическим факторам, в том числе регулирующим иммунные механизмы защиты [147; 198]. Например, установлено, что лица с генетическими дефектами в рецепторе интерферона-гамма (ИФН- γ) имеют повышенную восприимчивость к МБТ [135]. Большое внимание уделяется изучению роли полиморфизмов различных генов, в том числе гена ИФН- γ (*IFNG*), в развитии ТБ [8; 72; 81], 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 [355; 467], отсутствие эффективных инструментов, в том числе «золотого стандарта» для ее ранней диагностики и прогнозирования у детей [179; 315], наличие ограниченных данных по факторам прогрессирования туберкулезной инфекции у детей, включая генетические, несмотря на их большое практическое значение [249; 430], а также трудности, связанные с идентификацией специфических антигенов в зависимости от стадии туберкулезной инфекции для их использования в диагностических тестах у детей [355; 467], 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 оптимизации 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 *MCPI* (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 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, расширяют представление о ЛТИ у детей и участие генов *IFNG* и *MCP1* в ее прогрессировании. Проведенные исследования позволили установить специфические антигены, ответственные за раннюю стадию туберкулезной инфекции. Определена связь специфического иммунного ответа, клинического состояния и генотипа полиморфного варианта гена *IFNG*, что значительно расширяет представление об иммунопатогенезе ТБ.

Данные о наличии гетерозиготного генотипа полиморфного варианта гена *IFNG* (T-1488C) могут быть использованы в качестве дополнительного критерия при формировании групп высокого риска прогрессирования ЛТИ, а гетерозиготного генотипа полиморфного варианта гена *MCP1* (C-2508T) – прогрессирования ТБ, в первую очередь у детей, имеющих социальные факторы риска. Знания о наличии или отсутствии значимого генотипа полиморфизма гена *IFNG* могут быть использованы для персонифицированной ранней диагностики туберкулезной инфекции у детей.

Выделенные и стратифицированные значимые клинические факторы риска развития ЛТИ и ТБ позволят определить детей группы высокого риска по возникновению ЛТИ и ее прогрессированию.

Выявленные специфические иммунологические критерии, связанные с различными клиническими состояниями организма (от отсутствия туберкулезной

инфекции и ПВА до развития активного ТБ), позволят дифференцировать латентную и активную туберкулезную инфекции.

Разработанный алгоритм, по результатам комплексной оценки анамнестических, клинических, иммунологических и молекулярно-генетических данных, позволяет: на педиатрическом этапе выявить группу с высоким риском ЛТИ, на фтизиатрическом – провести дифференциальную диагностику латентной и активной инфекции, а также определить риски прогрессирования ЛТИ у детей, что в свою очередь 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).

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).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Латентная туберкулезная инфекция

Латентная туберкулезная инфекция определяется как состояние стойкого иммунного ответа на попавшие ранее в организм антигены *M. tuberculosis* при отсутствии клинических проявлений активной формы ТБ [90; 315; 324]. По оценкам экспертов ВОЗ, треть населения планеты инфицирована МБТ [182]. У подавляющего большинства инфицированных лиц отсутствуют признаки или симптомы ТБ, и эти лица не являются заразными, но у них есть риск развития активной формы ТБ, которая уже является заразной. По оценкам экспертов, риск реактивации ТБ в течение жизни для лица с зафиксированной ЛТИ составляет 5–10%, причем у большинства ТБ развивается в течение первых пяти лет с момента первичного инфицирования [180; 363; 440]. Тем не менее развитие ТБ после инфицирования МБТ зависит от нескольких факторов. Считается, что реактивацию ТБ можно предотвратить при помощи профилактического лечения. Эффективность имеющихся на настоящий момент схем лечения составляет от 60 до 90% [322]. Возможную пользу от лечения необходимо тщательно сопоставить с риском побочных явлений, связанных с приемом лекарственных средств. Учитывая несовершенство анализов, риск серьезных и фатальных побочных эффектов и высокую стоимость соответствующих мероприятий, по мнению экспертов ВОЗ, нецелесообразно проводить массовое обследование на ЛТИ и ее лечение среди широких слоев населения. [90]. По их заключению, базовыми элементами Глобальной стратегии борьбы с ТБ после 2015 г. являются мероприятия, ориентированные на пациента. В первую очередь это ранняя диагностика ТБ, систематический скрининг лиц, находившихся в контакте, и групп повышенного риска, а также профилактическое лечение лиц, подвергающихся повышенному риску и вакцинация против ТБ [26; 315]. В настоящее время руководства ВОЗ по ведению пациентов с ЛТИ разработаны для ВИЧ-инфицированных лиц [262], детей в возрасте до 5 лет, контактировавших с

больными ТБ в домашних условиях [388]. В 2015 и 2018 гг. ВОЗ представила программное руководство по ведению пациентов с ЛТИ, в котором уделено надлежащее внимание различным вариантам обследования и лечения. Кроме того, руководство по ведению пациентов с ЛТИ может стать одним из инструментов, способствующих реализации глобальной стратегии борьбы с ТБ после 2015 г., одобренной Всемирной ассамблеей здравоохранения в мае 2014 г., в которой поставлены амбициозные цели в виде снижения заболеваемости ТБ на 90% и смертности от ТБ на 95% [27; 90; 315].

ТБ по-прежнему входит в число инфекционных болезней, уносящих наибольшее число жизней [257; 258; 263; 429]. Согласно оценкам, число заболевших ТБ в 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 [257; 258; 429]. Показатели распространенности ТБ ежегодно медленно снижаются, однако принимая во внимание, что большую часть случаев смерти от ТБ можно предотвратить, показатели смертности от этой болезни продолжают оставаться на недопустимо высоком уровне и более 95% случаев смерти от ТБ происходит в развивающихся странах с низким и средним уровнем дохода [257; 258]. Анализ эпидемической ситуации по ТБ в России свидетельствует о наступлении стабилизации, при этом стабилизация не носит устойчивый характер в связи с развитием эпидемии ВИЧ-инфекции, что может привести к росту заболеваемости и распространенности ТБ, с ростом множественной лекарственной устойчивости МБТ к противотуберкулезным препаратам (МЛУ-ТБ). МЛУ-ТБ снижает результаты лечения и в перспективе может привести к росту смертности от ТБ [39]. Основные показатели по ТБ (заболеваемость и смертность) в России снизились и в 2014 г. составили 59,5 и 10,1 на 100 тыс. населения соответственно, что в 1,8 и 1,3 раза превысило минимальные показатели 1990-1991 гг. (34 и 7,7 на 100 тыс. населения соответственно). Несмотря на снижение заболеваемости ТБ и среди детского населения РФ в 2014 г. (13,2 на 100 тыс. детского населения), показатель заболеваемости еще не достиг уровня 1989-1990 гг. и в 1,8 раз его превысил (7,5

на 100 тыс. детского населения), находясь на уровне 1995 г. Такая же ситуация по заболеваемости складывается среди подросткового населения: в 2014 г. – 31,9 на 100 тыс. подросткового населения и 17 на 100 тыс. населения в 1990 г. (минимальный уровень показателя) [117; 129]. М. В. Шилова (2014) отмечает несоответствие между уровнями заболеваемости ТБ всего населения и детского, что, по мнению автора, свидетельствует об имеющихся недостатках в диагностике ТБ как у детей, так и у взрослых. О проблеме своевременной диагностики ТБ среди детей свидетельствует и рост числа детей, впервые выявленных с остаточными посттуберкулезными изменениями (IIIA группа диспансерного учета), так, если в 2001 г. соотношение среди впервые выявленных случаев ТБ активного и неактивного составляло 5:1, то в 2013 г. 2:1 [129]. Увеличение числа детей с остаточными посттуберкулезными изменениями, по мнению М. В. Шиловой (2014), связано с широким использованием диаскинтеста (ДСТ), что не позволяет своевременно выявить период первичной туберкулезной инфекции и провести превентивное лечение [129], при этом до 2015 г. данная проба не была рекомендована для использования в условиях общей лечебной сети, как основной метод выявления туберкулезной инфекции у детей оставалась проба Манту с 2 ТЕ ППД-Л [67; 69; 71; 124]. По исследованиям других авторов, причинами поздней диагностики ТБ являются низкая санитарная грамотность населения [62; 78; 116], массовый отказ от обследования (от пробы Манту с 2 ТЕ ППД-Л) (снижение охвата осмотрами детского населения на 7,4% с 2009 г., в 2013 г. – 85,3% [129], отсутствие настороженности по ТБ у врачей общей лечебной сети [45]. По данным Н. В. Келасовой (2007), до 70% случаев поздней диагностики ТБ в подростковом возрасте в том числе обусловлено отсутствием фтизиатрической настороженности, недооценкой роли туберкулинодиагностики (ТД) у подростков (нерегулярно проба Манту с 2 ТЕ ППД-Л – 45,3%, несвоевременное обследование – 59,7%) [45]. К 2013 г. также отмечается снижение показателя первичного инфицирования до 0,8%, или 751,5 на 100 тыс. детского и подросткового населения, что должно свидетельствовать об уменьшении количества источников инфекции. Так, по данным М. В. Шиловой

(2014), отсутствует корреляция между частотой первичного инфицирования и уровнем показателя распространенности бациллярных больных, и несоответствие этих показателей по сравнению с предыдущими годами возросло, что также связано с проблемой диагностики ТБ. Это положение подтверждают данные роста числа детей, заболевших из числа инфицированных МБТ, так, в 2013 г. 21 ребенок заболел туберкулезом (0-17 лет) на 1000 впервые инфицированных МБТ (в 2009 г. – 16) [129]. Данные показатели свидетельствуют не только о проблеме раннего выявления туберкулезной инфекции, но и о проблеме профилактики ТБ среди детей. С учетом выявленных проблем на основе законодательных документов по профилактике ТБ и рекомендаций ВОЗ (2015) были разработаны федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению ЛТИ у детей с целью оптимизации профилактических мероприятий по ТБ в первую очередь среди групп риска [124].

По мнению многих исследователей, к группе высокого риска по заболеванию ТБ можно отнести детей в возрасте до 7 лет и подростков, находящихся в условиях семейного и периодического контакта с больными ТБ, что обусловлено низким качеством проводимых противоэпидемических мероприятий, а также быстрым снижением напряженности поствакцинального иммунитета [78; 91]. ТБ у детей до сих пор следует расценивать как социально обусловленное заболевание [70]. Удельный вес социально-дезадаптированных семей может составлять до 52% от общего числа впервые выявленных больных ТБ детей. Основными показателями социальной характеристики семьи, оказывающими существенное влияние на степень социальной дезадаптации ребенка, являются: прожиточный минимум, уровень образования, состав семьи, смерть от ТБ одного из родителей, особенно матерей, значительная роль работы родителей (с высокой степенью дезадаптации каждый 5 родитель является инвалидом, в 63,2% инвалидность связана с ТБ), возраст родителей и регистрация брака, лишение родительских прав, пребывание в местах лишения свободы и употребление алкоголя (91,3%) и наркотиков (10,9%) [47; 91]. По мнению А. Г. Ким (2005), «социальный портрет» семьи ребенка с туберкулезной

инфекцией имеет свои особенности: это и плохие жилищно-бытовые условия семьи, и нахождение ребенка в прокуренном помещении более 3-х часов в день [47], и низкий уровень медицинской активности [47; 93]. По мнению М. Х. Сайфулина (2010), среди детей высокий риск по ТБ составили лица из закрытых учреждений – 11,5%, безнадзорные дети – 8,5% [93].

По результатам исследований А. Г. Ким (2005), на формирование туберкулезной инфекции оказывают влияние факторы риска, действующие на ребенка в перинатальном периоде жизни: угроза прерывания беременности на различных сроках ($r=23,4\%$, 1 общ=1,58), обострение хронических воспалительных заболеваний матери в период беременности ($r=37,9\%$, 1 общ=1,84), поздняя постановка на учет в женскую консультацию ($r=40,1\%$, 1 общ=2,19), нарушение беременной режима сна, отдыха, питания. Увеличивают риск реализации туберкулезной инфекции отклонения от нормального течения родов: длительный безводный период (1 общ=2,1), обвитие пуповиной вокруг шеи (1 общ=2,1), асфиксия в родах (1 общ=1,8), срок гестации (недоношенность, переносимость) и др. Повышают риск заболевания ТБ факторы, действующие на ребенка в постнатальном периоде: срок прикладывания к груди ($r=28,2\%$, 1 общ=1,76), масса тела при рождении ($r=27,6\%$, 1 общ=1,74). Выделение факторов риска позволяет дополнительно выявить до 25% детей с подозрением у них наличия туберкулезной инфекции [47]. При этом, по мнению Л. В. Поддубной (2007), наибольший риск формируется при сочетании медико-биологических и социально-эпидемиологических факторов, поздняя диагностика, несвоевременное обращение за медицинской помощью увеличивают в 17 раз риск прогрессирования инфекции и требуют совершенствования лечебно-профилактических мероприятий [78].

Еще одним важным профилактическим мероприятием могла бы стать вакцинация против ТБ. Единственная существующая вакцина против ТБ, бацилла Кальметта-Герена (БЦЖ), созданная в 1921 г., имеет неустойчивую защитную эффективность. БЦЖ-иммунизация считается эффективной у детей, обеспечивая 80%-ю защиту от тяжелой и прогрессирующей инфекции таких форм ТБ, как

милиарный ТБ и туберкулезный менингит [52; 454; 473,]. По результатам одних исследований БЦЖ снижает риск ТБ у взрослых в среднем на 50%, тогда как по другим эффективность может составлять от 0 до 80% в разных популяциях [164; 217]. Однако БЦЖ не обеспечивает надежной защиты от легочного ТБ, на который приходится основное бремя болезни в мире. Безопасная, эффективная и доступная по стоимости вакцина против ТБ могла бы стать значительным достижением в борьбе с этой болезнью [2]. Вакцинация БЦЖ эффективна в условиях эпидемиологического неблагополучия по ТБ только при проведении комплекса профилактических мероприятий, включая полную изоляцию ребенка от источника инфекции и лечение взрослых больных. Супер- и реинфекция детей в семейных очагах снижают протективные свойства вакцины, что повышает требования к качеству проведения прививки, обосновывает необходимость пересмотра сроков ревакцинации и усовершенствование вакцины [74; 78; 82; 131]. Современные стратегии борьбы против ТБ в большинстве развивающихся стран по-прежнему в значительной степени зависят от частично эффективной вакцины БЦЖ, а также от ранней диагностики и лечения активной туберкулезной инфекции [254].

Для определения того, каким же из 24 заранее определенных групп риска отдается приоритет при тестировании и лечении ЛТИ, по запросу ВОЗ было подготовлено три систематических обзора [90]. Фактические данные о повышенной распространенности ЛТИ, риске прогрессирования ЛТИ и развитии активной формы ТБ, а также о повышенной заболеваемости активной формой ТБ имелись по следующим 15 группам риска: 1) взрослые и дети, контактировавшие с больными ТБ; 2) работники системы здравоохранения и студенты-медики; 3) ВИЧ-инфицированные лица; 4) пациенты на диализе; 5) иммигранты из стран с высоким бременем ТБ; 6) пациенты, начинающие лечение по поводу фактора некроза опухоли (ФНО); 7) лица, употребляющие запрещенные наркотики; 8) заключенные; 9) бездомные; 10) пациенты, готовящиеся к трансплантации органов или переливанию крови; 11) пациенты с силикозом; 12) пациенты с диабетом; 13) лица, злоупотребляющие алкоголем; 14) табакокурильщики; 15)

лица с дефицитом массы тела. Был проведен систематический обзор для исследования тестов и клинических результатов, с помощью которых можно наилучшим образом определять лиц с наибольшим риском прогрессирования заболевания до впервые выявленного ТБ. И, если систематический обзор не выявил никаких клинических параметров, которые могли бы способствовать прогнозированию прогрессирования до активной формы ТБ, то 29 исследований свидетельствовали о прогностической ценности IGRA (интерферон-гамма-релиз анализ) и туберкулиновой кожной пробе (ТСТ). ТСТ и IGRAs (интерферон-гамма-релиз анализы) – основные анализы, доступные в настоящее время для диагностики ЛТИ. Человек с ЛТИ имеет отрицательные бактериологические анализы: диагноз основывается на положительном результате либо ТСТ, либо IGRA-тесте, указывающим на иммунный ответ у лиц с ЛТИ [366]. Однако эти тесты имеют ограничения, они не могут отличить скрытую инфекцию от активной [313], они также слабо могут предсказывать, кто будет прогрессировать к активной туберкулезной инфекции. Как указано в анализе 17 проспективных исследований, представленных в 2017 г., сравнивающих тестирование IGRA с ТСТ на прогрессирование от ЛТИ до ТБ, результаты следует интерпретировать с осторожностью из-за неопределенности, изменения рисков и их гетерогенности [179]. Вакцинация БЦЖ тоже может вызвать трудности в интерпретации ТСТ из-за генетического сходства БЦЖ и МБТ. Хотя имеющиеся эпидемиологические данные подтверждают, что на туберкулин реакция, связанная с вакцинацией БЦЖ, может угасать в течении 5-10 лет и он по-прежнему не дает возможность полностью дифференцировать, кто является зараженным МБТ, а кто привитым БЦЖ [312; 314; 360].

Термин «латентный ТБ» был придуман Пирке, который разработал кожный тест в 1907 г. с использованием туберкулина Коха (неочищенной смеси продуктов МБТ). Он ввел термин «скрытый туберкулез», чтобы описать детей, которые не проявляют какие-либо симптомы ТБ, но имеют положительную реакцию на туберкулин [192; 269].

Взаимодействия между МБТ и человеческим организмом являются многогранными и сложными и на сегодняшний день еще недостаточно изученными [138; 219; 319; 383; 392; 440; 422]. Новые технологии внесли свой вклад в разработку новых концепций по поводу этого взаимодействия. При этом особое значение имеют для данного обзора недавние исследования о характере иммунного ответа, которые подчеркивают гетерогенность при развитии активной и ЛТИ [210; 250; 254; 291; 319; 384; 440]. Хотя под ЛТИ традиционно подразумевается, что МБТ находится в какой-то неактивной форме в организме, развивается концепция, по которой под определением скрытой туберкулезной инфекцией подразумевают более широкий спектр от ситуации полного очищения от инфекции к ситуации активно реплицирующейся бактерии при отсутствии клинических симптомов [210; 250; 254; 291; 440; 483]. Кроме того, растет количество наблюдений субклинической активной инфекции при проведении обследований по распространенности ТБ [254; 272; 291].

Предложено, учитывая, что клиническое разнообразие при наличии туберкулезной инфекции отражает относительное количество, тип и анатомическое распределение поражений, лучше, если туберкулезная инфекция рассматривается как непрерывный спектр, простирающийся от стерилизации иммунитета, субклинического активного заболевания, до скоротечных активных форм заболевания, с традиционными обозначениями латентной инфекции и активной формы болезни, соответственно с частично перекрывающимися областями биологической неоднородности [254; 291; 440], как описано в рисунке 1.1 [254].

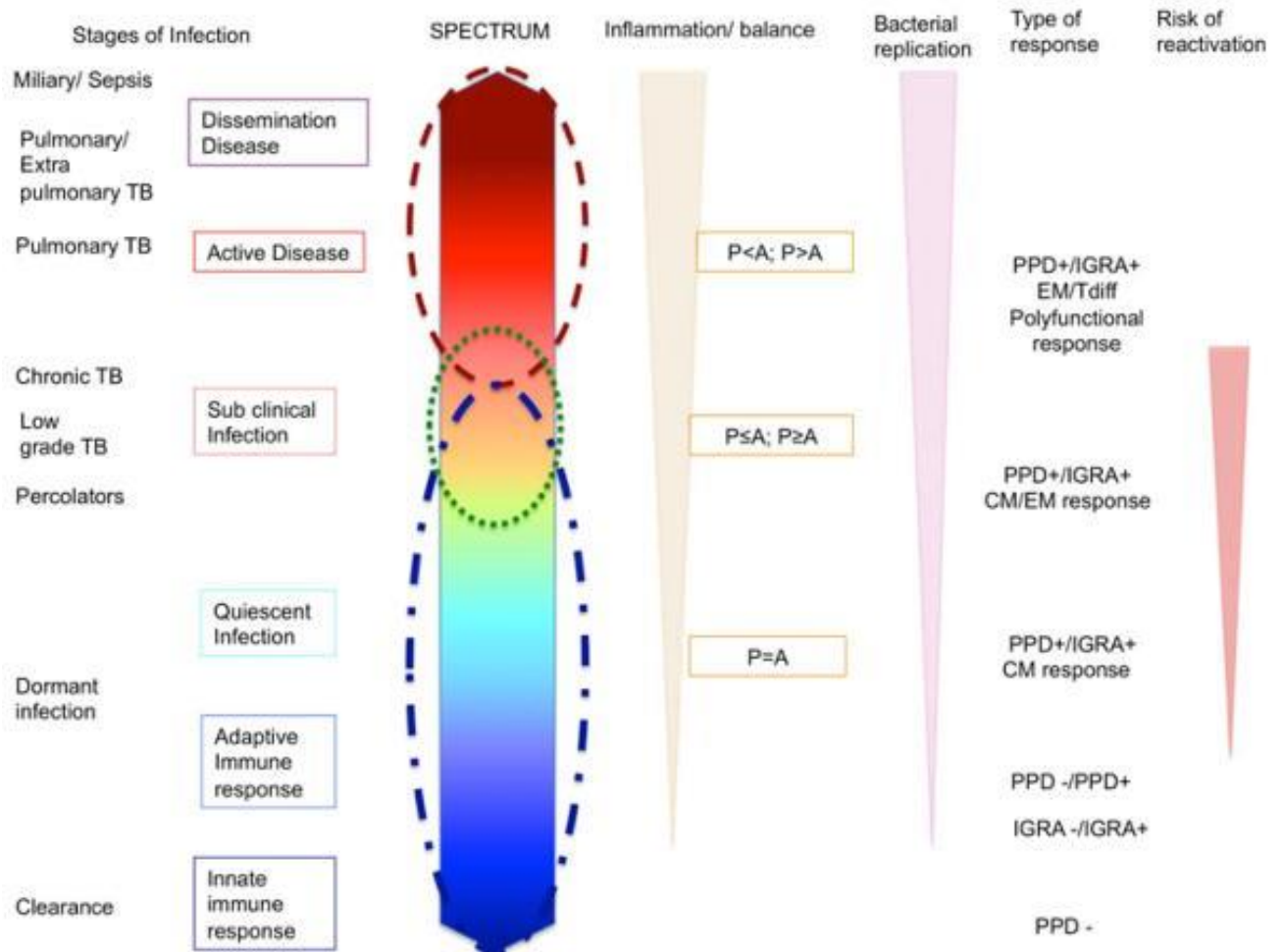


Рисунок 1.1 – Схема «спектра» туберкулезной инфекции*

Примечание:

*МБТ – инфекцию можно рассматривать как спектр на "тепловой карте" с соответствующими стадиями инфекции от бактериального клиренса (холодный – нижний конец [синий]) к диссеминированной (горячий – верхний конец [темно-красный]). Классическая, бимодальная классификация, основанная на наличии или отсутствии клинических симптомов: активная (отмечена черточками [красный]) и латентная (обозначена тире-точками [голубой]) инфекция, чтобы показать изменчивость в пределах этих категорий. Кроме того, недавние исследования подтверждают наличие субклинической инфекции (отмечена точками [зеленый]), которая перекрывается с активной и латентной формой. Бактериальные репликации, как ожидается, увеличиваются до спектра инфекции. Воспалительные факторы [Про- (P) и Анти- (A) воспалительный] находятся в равновесии на нижнем конце спектра, контролирующая репликацию бактерий, в то время как инфекция продвигается вверх по спектру, этот баланс теряется в результате увеличения бактериальной нагрузки и/или увеличения патологии. Аналогичным образом, положение на спектре изображает риск реактивации, выше по спектру свидетельствует о более высоком риске. Выявляемые реакции на PPD (туберкулин) или в IGRA может варьироваться от отрицательной до положительной в латентном спектра, хотя это умозрительно. Тип Т** - клеточного ответа в анализах *in vitro* в диапазоне от сниженных реакций центральной памяти на нижнем конце спектра к эффекторной памяти и терминально дифференцированных фенотипов с увеличением функциональных возможностей Т-клеток, при этом как они идут на высоком уровне спектра не было доказано [319; 440; 483].

**Т-клетки:

- Центральные клетки памяти Т секретируют IL-2, но не секретируют IFN- γ или IL-4.
- Эффекторные клетки памяти Т секретируют цитокины такие как IFN- γ и IL-4 [245, 371].

Основным недостатком настоящего времени является то, что ни один из диагностических анализов не обладает достаточной чувствительностью или специфичностью для определения у конкретного человека «места МБТ на спектре». Это тормозит развитие новых препаратов и вакцин-кандидатов, а также осуществление контроля за лицами с высоким риском, до того как они начинают формировать заболевание. Поэтому приоритетной задачей исследования является понимание спектра туберкулезной инфекции с имеющимися техническими достижениями для определения комбинации маркеров МБТ. Многочисленные вопросы, которые сегодня необходимо решить, включают в себя: Какие патологические или иммунологические особенности определяют спектр? Можно ли измерить продукты МБТ и соотнести их со спектром ТБ? Какова роль Т или В-клеток в спектре латентного ТБ? Что является переломным в реактивации и распространении? Они могут быть решены с помощью комплексного изучения иммунологических и клеточных маркеров в сочетании с оценкой транскрипционных профилей, использования передовых технологий обработки изображений в режиме реального времени и на уровне тканей и органов, чтобы понять сложность всех этапов МБТ-инфекции [254].

1.2. Иммунопатогенез и иммуногенетика туберкулезной инфекции

Mycobacterium tuberculosis является возбудителем ТБ, принадлежит к виду *Actinobacteria*, состоящему в основном из свободноживущих почвенных бактерий. МБТ обладает рядом уникальных особенностей, среди которых можно выделить необычное строение клеточной стенки, наличие большого числа нестандартных биохимических циклов, значительно увеличенное (по сравнению с другими бактериями) время удвоения численности бактериальной популяции [317; 372].

Достаточно необычно развивается заболевание [186; 255; 469]. МБТ сопровождается сложным комплексом иммунных реакций в организме человека, причем наиболее общим является результат пожизненного контроля инфекции.

Тем не менее, когда баланс иммунных реакций нарушается, может сформироваться первичный ТБ или произойти реактивация латентной инфекции.

Чаще всего инфицирование происходит при вдыхании аэрозоля, содержащего микобактерии. МБТ достигают терминальных альвеол, где захватываются макрофагами путем эндоцитоза, в результате чего бактерии оказываются в фагосомах. Далее в процессе фагоцитоза фагосомы сливаются с лизосомами, и в образующихся фаголизосомах бактерии подвергаются воздействию сред с низким значением pH, активных форм кислорода, радикалов NO, лизосомальных ферментов и токсических пептидов. Однако МБТ блокируют слияние фагосом с лизосомами и благодаря этому выживают и размножаются в макрофагах [170; 239]. Дальнейшее развитие заболевания связано с образованием в ходе иммунного ответа так называемых гранул, которые, с одной стороны, препятствуют возникновению системной инфекции, а с другой – способствуют размножению МБТ, изолируя их от воздействия иммунной системы [220]. При этом инфицирование МБТ продолжается, так как защитные механизмы не могут очистить организм хозяина от патогена, но инфекция не оказывает видимого воздействия на его самочувствие. Это так называемое состояние хронической, или латентной, инфекции, которое может длиться десятилетиями [167; 210; 240]. Снижение уровня иммунитета может привести к реактивации инфекции, в результате чего развивается активный ТБ.

Гранулемы являются патологическим признаком ТБ. Гранулема – это организованная структурная совокупность иммунных клеток, формирующаяся в ответ на воспаление легких вследствие взаимодействия иммунных клеток-хозяев с антигенными стимулами МБТ, что приводит к набору нескольких типов клеток. Первичным клеточным компонентом гранулемы является макрофаг [241]. Роль макрофагов в гранулеме была рассмотрена совсем недавно [205; 241]. Макрофаги иницируются и формируют основной тип клеток в гранулеме. Кроме того, в гранулеме присутствуют $CD4^+$, $CD8^+$ Т-клетки, В-клетки, нейтрофилы и фибробласты. Макрофаги в первую очередь поглощают МБТ для осуществления возможности их лизировать. Их основная функция заключается в

антимикобактериальной защите, в том числе через регуляцию про- и противовоспалительной продукции цитокинов [205; 328; 391]. Гранулемы могут рассматриваться в качестве ниши, в которой МБТ могут расти или сохраняться, а также в качестве иммунологической среды, в которой взаимодействуют клетки-хозяева для осуществления контроля и предотвращения распространения МБТ. Таким образом, само по себе образование гранулемы является недостаточным фактором для контроля инфекции, но надлежащее функционирование гранулемы определяет конечный исход инфекции [210; 241]. Выделяют несколько типов гранулем. Среди них имеются казеозные гранулемы, включающие Т- и В-лимфоциты, макрофаги и нейтрофилы. Казеозная гранулема в латентной инфекции может быть кальцинированная с несколькими воспалительными клетками. Неказеозная гранулема главным образом образована макрофагами с меньшим количеством лимфоцитов и обнаруживается в основном при активной инфекции. Некротические нейтрофильные гранулемы и полностью фиброзные гранулемы могут наблюдаться у инфицированных МБТ пациентов [241; 384]. Мероприятия, направленные на модуляцию функции макрофагов, могут быть полезны для предотвращения болезни, но нужно подходить к их осуществлению с осторожностью, так как мы до конца не понимаем баланса клеток и медиаторов, необходимых, чтобы убить МБТ, но предотвратить патологию легких. Это остается важной областью для дальнейшего изучения [241].

В ходе недавних исследований была выявлена подгруппа генов МБТ, которые специфически экспрессируются при внутриклеточной инфекции и кодируют элементы, необходимые для выживания и нарастающего инфицирования хозяина. Выявлены также микобактериальные механизмы блокирования иммунного ответа со стороны клетки-хозяина. Тем не менее, знание структуры генома не позволяет делать выводы о причинах течения конкретного инфекционного процесса, равно как не дает возможность определить, за счет каких факторов МБТ выживают внутри макрофагов, как образуются гранулемы и каким образом осуществляется долговременное персистирование МБТ в легких. Развитие функционального ответа МБТ на изменения условий внешней среды

происходит крайне быстро, что увеличивает сложность изучения этого процесса. Первыми исследованиями транскриптома МБТ *in vivo* являются работы D. Schnappinger и соавт. (2003) [449] и H. Rachman и соавт. (2006) [353]. Была изучена экспрессия генов МБТ в активированных и неактивированных мышинных макрофагах и выявлены дифференциально экспрессирующиеся гены. В результате анализа был определен так называемый «коровый (основной) внутриклеточный транскриптом», представляющий собой некий набор транскриптов, экспрессирующихся при персистировании МБТ внутри макрофага. На основании данных, полученных разными авторами в системе *in vivo*, можно выделить ряд основных отличительных черт транскриптома, характерных для МБТ, персистирующих внутри макрофагов. Это в основном изменения в экспрессии генов, требующихся для адаптации патогена к неблагоприятным и/или специфическим условиям внутри макрофагов, а также генов различных факторов модуляции иммунного ответа. МБТ, попадающие внутрь макрофагов, находятся во внутреннем пространстве фагосом, что наряду с преимуществами, связанными с защитой от компонентов иммунной системы, приводит также и к усложнению доступа патогена к питательным веществам и микроэлементам. Изменения в экспрессии генов МБТ прежде всего направлены на формирование микроокружения, способного поддерживать функциональную активность МБТ *in vivo*. Взаимодействие МБТ с макрофагом начинается с момента прикрепления бактерии к поверхности макрофага. Можно было бы ожидать, что первичное изменение экспрессии генов патогена происходит уже в этот момент и служит подготовкой бактерии к условиям внутри макрофага. Тем не менее подобной перестройки транскрипции не происходит: заметные изменения профиля экспрессии генов патогена наблюдаются уже на первых минутах с момента его захвата макрофагом [394]. Среди генов, экспрессия которых активируется первой, выделяются различные гены регулонов, например, *phoP* (служит сенсором кислотности среды) [432], включающего гены факторов ремоделирования клеточной стенки. У мутантов МБТ по гену *phoP* нарушен синтез липидов РАТ, DAT и ManLAM и не секретируется ESAT-6/CFP-10 [298]. Это приводит к

нарушениям в способности МБТ эффективно блокировать взаимодействие фагосомы с лизосомами и выражается в явно сниженной вирулентности мутантов МБТ по *rhoP* [146]. Таким образом, транскрипционная активность регулона *rhoP* может служить не только для предотвращения закисления содержащей МБТ фагосомы, но и для предотвращения ее созревания, являясь одним из наиболее важных первичных адаптивных изменений. Интересно отметить, что одним из факторов, связанных с невыполнением защитной функции БЦЖ в эндемичных по ТБ районах, является способность БЦЖ препятствовать слиянию фагосомы с лизосомой [320; 351; 352; 391]. Это вмешательство в обработке антигена и презентации Т-клеткам приводит к дефекту Т-клеточного ответа.

МБТ не допускают своего полного уничтожения и тем самым излечение от инфекции происходит путем перехода их в так называемое покоящееся (дормантное) состояние, в котором они невосприимчивы к воздействию перечисленных негативных факторов. На системном уровне болезнь переходит в так называемое латентное состояние [143; 168]. В состоянии латентной инфекции внешне не наблюдается негативных проявлений болезни, то есть воздействие патогенна на общее состояние инфицированного организма становится минимальным. Механизм, за счет которого происходит переход бактерии в дормантное состояние, не вполне ясен [284; 401; 426; 427; 431; 472; 485]. Данные, касающиеся физиологического состояния бактерий, находящихся в дормантном состоянии, противоречивы [173]. Окончательно не установлено точное место локализации бактерий, пребывающих в дормантном состоянии [219]. Неясно, что из себя конкретно представляет это состояние, то есть является ли оно действительно дормантным, не сопровождающимся клеточными делениями [392], либо же клеточное деление продолжает осуществляться [138]. В последнем случае непонятно, все ли МБТ активны и участвуют в поддержании динамического равновесия между репликацией МБТ и их гибелью в результате активности иммунной системы, либо же в организме также присутствует и популяция МБТ в истинно дормантном состоянии. В том случае, если верно предположение, что при латентной инфекции бактерии находятся в дормантном

состоянии, то неясно, какова природа этого состояния. Можно выделить два основных типа такого состояния: за счет действия внешних неблагоприятных факторов, прекращение воздействия которых приводит к восстановлению способности к размножению бактерий, что наблюдается в модели Вейна (Wayne model, NRP – non replicating persistence) [475], либо за счет перехода МБТ в особое состояние, которое характеризуется определенным уровнем метаболической активности, но восстановление возможности к размножению таких бактерий неосуществимо без воздействия экзогенных факторов (модель VBNC, viable but non culturable) [173; 362; 485]. В зависимости от того, что представляют собой МБТ в дормантном состоянии, возможны два варианта реактивации ТБ: за счет локального выхода бактерий из дормантного состояния (статическая гипотеза латентного ТБ) [365] либо за счет постоянной эндогенной реинфекции (динамическая гипотеза латентного ТБ) [166]. Согласно этой модели, в организме хозяина одновременно присутствуют как активно делящиеся бактерии, так и бактерии в дормантном состоянии; их взаимодействие друг с другом, а также с клетками иммунной системы, определяет проявление инфекции на уровне организма. Еще одним доказательством против концепции «дремлющих» МБТ в качестве единственной бактериальной популяции в скрытой форме ТБ является то, что установлено эффективное лечение латентного ТБ. Использование 6-12 месяцев профилактической терапии изониазидом связано со снижением риска реактивации 60% (95% ДИ 48-69%) у иммуносупрессированных лиц [304; 452] и возможной ликвидации инфекции [428].

Механизмы, обуславливающие ограничение выживания МБТ во время латентной фазы, связывают с врожденным иммунитетом [297]. За последние несколько десятилетий исследования, связанные с защитой от МБТ, были в значительной степени сосредоточены на Т-клетках из-за их замечательной способности генерировать МБТ-специфический иммунитет [418]. Несомненно, что Т-клетки играют важную роль в защите от МБТ. Однако в последнее время информация, что Т-клетки являются стражами в МБТ защите, отчасти из-за

значительного периода запаздывания между инфекцией и установлением специфических Т-клеточных реакций, находится под сомнением [466]. В многочисленных экспериментальных работах отечественных исследователей, проводимых еще в 60-х гг. прошлого века, была подчеркнута важная роль врожденного иммунитета в отношении формирования устойчивости к ТБ [38].

Набор клеток-контроллеров к месту инфекции с последующим МБТ представлением и транспортировкой в направлении лимфатических узлов для простых наивных Т-клеток занимает 9-11 дней после вторжения возбудителя. Следовательно, активация Т-клеток происходит после того, как проходит значительное время пребывания инфекции. Эта задержка, между началом инфекции и созданием специфических эффекторных Т-клеток, обеспечивает достаточное время для сохранения МБТ. Все это в последующем затрудняет обработку антигена и представление их наивным Т-клеткам [393]. В конечном счете это препятствует генерации и распространению противотуберкулезного Т-клеточного ответа. Однако несмотря на лаг-фазы в Т-клеточных реакциях, более 90% инфицированных МБТ людей являются бессимптомными носителями, что увеличивает возможность участия других факторов в борьбе с ТБ. Защита во время начальной фазы инфекции ясно показывает, что Т-клетки не на переднем крае борьбы с инфекцией, скорее, компоненты врожденной иммунной системы играют ключевую роль в формировании эффективного иммунитета против МБТ [321; 361; 391]. Поэтому важно изучать механизмы, ответственные за сдерживание роста МБТ во время фазы запаздывания Т-клеточного ответа. Понимание этих механизмов может проложить пути в разработке новых терапевтических стратегий и вакцин для более эффективного противотуберкулезного иммунитета [297; 321]. В прошлом роль врожденного иммунитета игнорировалась, все было направлено на индукцию адаптивного ответа против МБТ. Последние отчеты показывают, что функция врожденного иммунитета является еще более эффективным механизмом, чем Т-клеточный ответ против МБТ [175; 236; 443]. Кроме того, оптимально приобретенный иммунный ответ не является достаточным, чтобы компенсировать дефектный

врожденный иммунитет. На основании последних исследований врожденных иммунных клеток [188; 189; 215; 277; 335; 336], врожденный иммунитет приобрел гораздо больший импульс благодаря своей глубокой роли в раннем контроле над МБТ инфекцией и в поддержании Т-клеточного ответа [391; 408].

Врожденные иммунные клетки (в том числе клетки MPS – мононуклеарной фагоцитарной системы) экспрессируют рецепторы распознавания образца (PRR), которые распознают эволюционно сохраняющиеся микробные молекулы, известные как связанные с патогенами молекулярные структуры (PAMPs) [337]. Распознавание через PRR, такие как рецепторы лектинов С-типа (CLR), NOD-подобные рецепторы и toll-like рецепторы (TLR), позволяют этим клеткам инициировать ответы на широкий спектр потенциальных патогенов. Когда клетки врожденного иммунитета, такие как альвеолярные макрофаги, распознают МБТ, активируется уникальный набор PRR. Это вызывает сигнальный каскад внутри макрофага, что приводит к выработке иммунных модуляторов, адаптированных к МБТ. Эти иммуномодуляторы могут вызывать локальные воспалительные реакции и обеспечивать коллимуляцию, необходимую для активации и пролиферации адаптивных иммунных клеток, таких как CD4⁺ Т-клетки [337].

Клетки MPS на месте инфицирования запускают каскад событий, необходимых для высвобождения различных провоспалительных цитокинов, таких как IL-1 β (интерлейкин), IL-6, IL-12, TNF- α (фактор некроза опухоли-альфа) и IL-18 [391]. Защитная функция IL-1 во время МБТ-инфекции была впервые продемонстрирована у мышей, страдающих недостаточной идентификацией IL-1 α / β или IL-1R1 [397]. Было также показано, что мыши, лишенные IL-1 β , IL-1 рецептора или IL-18, были более склонны к МБТ-инфекции и ее тяжелому течению. Известно, что продукция IL-1 β связана с ранней секретируемой антигенной мишенью секреторной системы 1 (ESX-1) 6 кДа (ESAT-6) МБТ, которая способствует экспрессии генов вирулентности, кодируемых областью разницы (RD-1) и которая отсутствует в БЦЖ [391]. Исходя из вышеприведенных наблюдений, можно предположить, что отказ БЦЖ индуцировать оптимальную защиту при ТБ объясняется отсутствием IL-1 β и IL-18, опосредованным RD-1

[437]. Проведены исследования фенотипических и функциональных свойств макрофагов, генерированных из моноцитов крови здоровых доноров и больных ТБ легких, включая больных с сохранным и сниженным ответом на очищенный туберкулин (ППД). Они показали, что у ППД-анергичных больных низкое содержание макрофагов, экспрессирующих антигены HLA-DR и CD86, наблюдается дисбаланс продукции цитокинов (уменьшенная секреция IFN- γ (интерферон-гамма), IL-18 и повышенная продукция IL-6, IL-10), а также низкая аллостимуляторная активность в смешанной культуре лимфоцитов. Полученные данные также позволяют предположить наличие взаимосвязи между изменением свойств макрофагов и нарушением антигенспецифического Т-клеточного ответа при туберкулезной инфекции [31].

В ряде исследований показано, что MPS помогает в дифференцировке Т-клеток, DCs (дендритные клетки) выделяют IL-12, что приводит к генерации Th1-клеток. Более того, клетки Th1 (Т-хелперные клетки I типа) в основном секретируют IFN- γ , который активирует макрофаги для высвобождения TNF- α [476]. Аналогично IL-6 и TGF- β (трансформирующий фактор роста-бета), секретируемые MPS, помогают дифференцировать наивные Т-клетки в фенотип Th17 [160]. Th1-клетки и клетки Th17 могут взаимно регулировать функцию Th2-клеток и Tregs (регуляторные Т-клетки) соответственно. Доказано, что Th2-клетки и Tregs способствуют прогрессированию ТБ [391], а образование Th1-клеток и клеток Th17 создают потенциал для успешного контроля над МБТ-инфекцией [325]. Таким образом, активация врожденных иммунных клеток с высвобождением провоспалительных цитокинов помогает в фагоцитозе бактерии с последующей активацией МБТ-реактивных Т-клеток, которые играют важную роль в контроле роста МБТ.

Оксид азота считается мощным антимикробным агентом, который производится клетками врожденного иммунитета. Активированные макрофаги являются основными производителями оксида азота [200], снижение экспрессии фермента iNOS (синтазы оксида азота) приводит к значительному увеличению микробной нагрузки [285]. Стимуляция врожденных молекул, таких как TLR

(толл-подобных рецепторов) или Nods, вызывает экспрессию iNOS, что в конечном итоге убивает МБТ, о чем свидетельствует анализ колониеобразующих единиц (КОЕ) [172]. Интересно отметить, что у пациентов, инфицированных МБТ с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), производится меньше NO [354]. После проникновения МБТ-инфекции Т-клетки производят IFN- γ . IFN- γ индуцирует продукцию NO [238]. МБТ вызывает гибель некоторых популяций Т-клеток и предотвращает гибель макрофагов с нарушенными бактерицидными и антипрезентирующими функциями, вероятно, служащих местом для длительного персистирования МБТ. Ответом макрофагов на МБТ является запуск механизмов апоптоза – важнейшего компонента эффективной антимикобактериальной защиты. Вирулентные МБТ уходят от этой защиты, индуцируя некроз, приводящий к их неконтролируемому размножению в некротизированной ткани. Дезрегуляция апоптоза нейтрофилов, вовлеченных в процесс острого воспаления в различных тканях, может приводить к пролонгации и хронизации воспалительного процесса [266]. В дополнение к ограничению МБТ-роста в период ранней фазы инфекции апоптоз играет значительную роль в индукции приобретенного клеточного иммунного ответа [151]. Роль обоих лимфоцитов CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток в иммунитете против МБТ доказана. Тем не менее механизм, лежащий в основе представления антигенов Т-клетками CD8⁺ в контексте с молекулами МНС-I, остается неизвестным. В последнее время было показано, что апоптоз инфицированных макрофагов облегчает высвобождение микобактериальных антигенов в апоптотических везикулах, и тем самым дает им доступ для представления антигена CD8⁺ Т-клеток [151]. Таким образом, можно сделать вывод о том, что запуск апоптоза может эффективно контролировать роста МБТ в ранние моменты времени, на более поздних стадиях он потенциально способствует генерации антиген-специфических CD8⁺ Т-клеток.

Нейтрофилы являются клетками врожденного иммунитета. Они играют важную роль в защите от МБТ [150], помогают макрофагам устранять инфекцию. Нейтрофилы фагоцитируют МБТ; зараженные нейтрофилы подвергаются апоптозу [149] и фагоцитируются макрофагами [357]. Кроме того, ингибированные

апоптозом нейтрофилы задерживают премирование $CD4^+$ Т-клеток [150]. Отсюда следует, что апоптоз играет решающую роль в борьбе с МБТ-инфекцией путем активации врожденного, а также адаптивного иммунитета. При стимуляции МБТ нейтрофилы выделяют хемокины (IP-10, MCP-1, MIP-1 α / β) и провоспалительные цитокины (IFN- γ и TNF- α) для приема и активации других иммунных клеток [152; 405], однако эти эффекторные молекулы также опосредуют повреждение легочной ткани и устойчивый гиперактивированный воспалительный ответ [263].

Подавление роста и элиминация МБТ определяется эффективностью межклеточного взаимодействия макрофагов и Т-лимфоцитов, что приводит к активации как цитотоксической функции макрофагов, так и самих лимфоцитов. Одним из ключевых факторов, стимулирующих цитотоксическую активность макрофагов, является IFN- γ , продуцируемый Т лимфоцитами 1-го типа. Как было показано ранее, активация этой субпопуляции лимфоцитов рассматривается в качестве необходимой составляющей эффективного контроля за туберкулезной инфекцией. МБТ активируют каскад событий, как отмечалось выше, опосредующих высвобождение массива провоспалительных цитокинов, таких как IL-6, IL-12 и TNF- α , которые играют защитную роль в выявлении врожденного иммунитета [184]. Аналогичным образом IL-1 β и IL-18 играют важную роль в противотуберкулезной защите. При этом IL-18 усиливает выработку IFN- γ , а снижение выработки IFN- γ отмечается при нарушении функции NK-клеток. Так, по результатам К. Kawakami с соавт. (2000), введение IL-12, а также IL-18 увеличивало сывороточные уровни IFN- γ и значительно восстанавливало уменьшенное сопротивление хозяина. Также в их исследовании установлено, что IL-18 способствует сопротивлению криптококковой инфекции через индукцию IFN- γ продукции клетками NK, но не через Th1-клетки, в которых синтез IL-12 несовершенен [288].

Таким образом, врожденный иммунитет эффективно контролирует рост МБТ во время ранней фазы инфекции. Кроме того, он создает платформу для адаптивного иммунитета [411; 453].

Т-лимфоциты считаются решающими для преодоления острой МБТ-инфекции [183; 185]. В ряде исследований было показано, что МБТ-специфические полифункциональные Т-клетки связаны с антигенной нагрузкой при развитии заболевания [412]. Эти результаты согласуются с идеей, предложенной R. A. Seder с соавт. (2008) [404], что величина первоначального воздействия антигена будет регулировать степень дифференциации и функциональные возможности клеток [210]. Большинство Т-клеток при развитии инфекции являются цитотоксическими Т-клетками, Th1-клетками, клетками Th17 и регуляторными Т-клетками (T-Regs), которые модулируют продукцию цитокинов другими типами клеток [412]. Основная роль $CD4^+$ Т-клеток – вырабатывать цитокины, которые помогают регулировать другие иммунные клетки, $CD4^+$ Т-клетки действуют совместно с врожденными и другими адаптивными иммунными клетками для защиты хозяина от патогенов. Во время первичных иммунных ответов Т-клетки $CD4^+$ активируются во вторичных лимфоидных органах, где они усиливают антипатогенную реакцию путем стимуляции ответов В-клеток и поддержки активации Т-клеток $CD8^+$. Активированные Т-клетки $CD4^+$ также мигрируют из вторичных лимфоидных органов в участки воспаления, где они участвуют в контроле и/или очищении патогена. После контроля или очистки от патогенов подавляющее большинство активированных Т-клеток $CD4^+$ подвергается апоптозу, но часть из них сохраняется, обычно около 10%, образуя популяцию долгоживущих клеток памяти. Эти ячейки памяти сохраняют знания об исходном иммунном ответе, что позволяет им более эффективно реагировать после вторичной инфекции [260]. Исследования лиц с сочетанной инфекцией ВИЧ-1 и МБТ предоставляют доказательства того, что снижение количества $CD4^+$ Т-клеток повышает риск развития ТБ, также увеличение $CD4^+$ числа Т-клеток с использованием антиретровирусной терапии коррелирует с уменьшением риска развития активного ТБ, предполагая, что эти Т-клетки играют важную роль в защите от ТБ [326]. МБТ-специфические $CD4^+$ Т-клетки продуцируют, главным образом, цитокины Th1, которые включают IFN- γ , IL-2 и TNF [264]. Защитную роль IFN- γ

лучше всего демонстрирует тот факт, что люди с дефектным 1 типа цитокинового пути плохо контролируют непатогенные микобактерии [135]. Так, введение анти-ФНО моноклональных антител (инфликсимаб) способствовало реактивации ТБ у пациентов [456]. Хотя IFN- γ имеет важное значение для человека в защите от МБТ, все чаще признается, что секреция IFN- γ является плохим коррелятом защиты в полевых исследованиях ТБ [264]. Это происходит частично из-за того, что секреция IFN- γ возрастает при антигенной (бактериальными) нагрузке [342]. Больше внимание уделяют IL-2, что связано с формированием иммунологической памяти [214]. Возникающая картина свидетельствует о различных IFN- γ / IL-2 функциональных профилях, которые коррелируют с различными моделями инфекции [214]. В течение нескольких часов после инфекции на ее ранней стадии производятся IFN I и II типов в одинаковых количествах. Этот общий провоспалительный путь действует синергетически, чтобы вызвать оптимальный иммунный ответ на ТБ, в частности, рекрутирование, дифференцирование и выживание дендритных клеток и макрофагов в легких [201; 252; 451]. Сообщается, что производство IFN I типа (IFN- α и IFN- β) во время туберкулезной инфекции способствует развитию заболевания [252; 451]. Они вызывают иммуносупрессию макрофагов и активацию цитокина IL-10, следовательно, блок Th1 иммунного ответа и подавления защитных цитокинов хозяина, таких как TNF- α , IL-12 и IL-1 β [252; 451]. Кроме того, когда IFN обоих типов I и II находятся в одинаковой концентрации, IFN I типа ограничивают экспрессию IFN- γ -индуцированного класса МНС II на антигенпредставляющие клетки (APCs) [464]. Через несколько дней после инфицирования адаптивный иммунный ответ на ТБ оптимально активируется, когда CD4⁺ и CD8⁺ эффекторные Т-клетки оказываются в легких, где они производят IFN- γ [201]. На этом этапе концентрация IFN- γ будет в десять раз выше, чем концентрация IFN I типа [201]. При этом несмотря на заявление о снижении роли IFN- γ в защите от ТБ, многие исследования показали, что ответные реакции Th1, связанные с продукцией IFN- γ , имеют решающее значение для иммунного ответа при МБТ-инфекции [201; 396], так как данный цитокин становится преобладающим

иммуномодулирующим регулятором, реализующим рекрутирование Т-клеток, индукцию экспрессии молекул МНС II класса, увеличение APC и контроль роста МБТ [201].

В течение латентного ТБ сохраняется повышенный риск реактивации инфекции [254]. Реактивация латентного ТБ может произойти через несколько лет или десятилетий после первичной инфекции в организме человека, что свидетельствует о том, что скрытая инфекция представляет собой динамический процесс между иммунной системой хозяина и бактериальной репликацией. Факторы риска для реактивации включают иммуносупрессию, например, ВИЧ, стероиды, или анти-ФНО терапию; недостаточное питание; курение; алкоголь; сахарный диабет; почечную недостаточность и злокачественные новообразования [309; 456; 474]. ФНО (фактор некроза опухоли) играет важную роль в иммунной реакции на ТБ, включая активацию макрофагов, апоптоза, хемокинов и экспрессии молекул адгезии [463].

Активация макрофага при помощи IFN- γ и TNF- α имеет негативные последствия для находящейся внутри микобактерии [221]. Как уже отмечено ранее, к этим последствиям относятся: 1) возобновление процесса созревания содержащей МБТ фагосомы, которое сопровождается закислением ее внутреннего пространства и дальнейшим снижением доступности питательных веществ и микроэлементов для бактерий, находящейся в фагосоме; 2) воздействие активных форм кислорода и азота; 3) возможность апоптотического пути клеточной смерти инфицированного макрофага, что приводит к элиминации патогена. Несмотря на существование у МБТ ряда механизмов, противодействующих негативным изменениям в физиологии их клетки-хозяина [419], полностью предотвратить эти явления бактерия не в состоянии, что может привести к последующему уничтожению МБТ-клеток.

Впоследствии подавление роста и элиминации МБТ определяется эффективностью межклеточного взаимодействия макрофагов и рекрутированных антигенспецифических Т-лимфоцитов. Так, в ответ на Т-клеточные активирующие сигналы происходит выраженное усиление цитотоксической

активности макрофагов, направленной против внутриклеточных патогенов. Поскольку одним из ключевых факторов, стимулирующих цитотоксическую активность макрофагов, является IFN- γ , продуцируемый Th1, активация Th1 рассматривается в качестве необходимой составляющей эффективного контроля за туберкулезной инфекцией [271; 280].

Финальной стадией ТБ является реактивация инфекционного процесса, при этом вероятность реактивации в организме инфицированного человека составляет до 10-15% в течение жизни [153; 257]. Данных об изменениях метаболического состояния МБТ в ходе реактивации ТБ и о сдвигах в экспрессии бактериальных генов, связанных с реорганизацией метаболизма, на текущий момент недостаточно [306; 307; 438; 459].

Таким образом, несмотря на накопленный объем данных и значительный уровень понимания физиологии МБТ в ходе инфекции в целом, процессы, связанные с переходом в дормантное состояние у МБТ, а также с реактивацией латентной инфекции, требуют дальнейшего изучения.

Считается, что в защите от ТБ немаловажная роль может принадлежать генетическим факторам, в том числе регулируемыми иммунные механизмы защиты [147; 198; 261; 470]. Например, наличие 01 аллели гена HLA DRB рассматривается как фактор, достоверно определяющий невосприимчивость к ТБ [98]. Современные концепции и технологии в медицине направлены на поиск генетических, в том числе иммуногенетических, маркеров подверженности к различным заболеваниям, в частности, инфекционным [25; 85; 243]. Так, установлено, что лица с генетическими дефектами в рецепторе IFN- γ имеют повышенную восприимчивость к МБТ [135]. Полиморфизмы генов, контролирующих защитные реакции организма, определяют различный характер протекания воспалительного ответа и специфических иммунологических реакций при внедрении патогенов. Многочисленные исследования показали наличие положительной ассоциации системы HLA с развитием туберкулезной инфекции в различных популяциях. Верификация групп риска в возникновении и неблагоприятном течении ТБ органов дыхания связана с идентификацией генов,

от которых зависит восприимчивость или резистентность организма человека к туберкулезной инфекции. Л. И. Арчаковой с соавт. (2009) было доказано, что при выявлении в генотипе аллеля HLA-DQB1*05 прогнозируется риск развития ТБ органов дыхания и неблагоприятное его течение [37]. В исследовании С. В. Беляевой (2014) установлено, что комбинации генов системы HLA-A*02, A*24, DRB1*16 и гаплотипов A*24-DRB1*16, DRB1*16-DQA1*01:02-DQB1*05:02 могут использоваться в качестве этногеографических маркеров потенциального риска развития активной формы ТБ, а выделение гаплотипов генов системы HLA, в составе которых присутствует высокопродуктивный аллель TNFA(-308)*A: HLADRB1*16-TNFA(-308)*A, HLADRB1*03-TNFA(-308)*A и анцестральный европеоидный АН 8.1., могут рассматриваться у русских Челябинской области в качестве маркеров потенциального риска развития активного ТБ и его тяжелых клинических форм: фиброзно-кавернозной, инфильтративной в фазе распада и экссудативного плеврита [16]. Н. В. Ставицкая с соавт. (2010) доказали, что при выявлении генотипа GG в интроне 4 гена NRAMP1, аллелей *04 и *16 гена HLA DRB1 и снижении цитокинового индекса (менее 2, (IFN /IL-4 и IL-18/IL-10) определяют прогрессирование латентной туберкулезной инфекции у детей (RU2405151C2) [102]. В формировании адекватного иммунного ответа против патогенов чрезвычайно важны межгенные и внутригенные взаимодействия, дестабилизация которых может приводить к неблагоприятным исходам заболеваний. Прежде всего это касается генов регуляторных молекул, обеспечивающих начальные этапы развития воспалительной реакции: распознавание патогена, проведение внутриклеточного активационного сигнала и синтез медиаторов развития воспалительной реакции, в состав которых входят и цитокины [97]. Мутации генов некоторых цитокинов, играющих важную роль в механизмах иммунологической защиты против МБТ, а также мутации генов, кодирующих рецепторы к этим интерлейкинам, могут играть свою роль в предрасположенности к ТБ. Большое внимание уделяется изучению роли полиморфизмов гена *INFG* в развитии заболеваний [97; 369]. Описаны случаи летальной БЦЖ-инфекции у детей с врожденным дефектом

экспрессии рецепторов к IFN- γ [295]. Е. Л. Никулиной с соавт. (2010) было установлено, что иммуногенетическим фактором, обладающим протективным эффектом в отношении подверженности ТБ легких, является аллель Т и гомозиготный генотип ТТ полиморфизма +874А/Т гена *INFG*. Подверженность туберкулезной инфекции ассоциирована с аллелем А, а также с генотипами АА и АТ полиморфизма +874А/Т гена *INFG* [8]. А. В. Поспелов (2011) в исследовании также указал, что гомозигота по аллелю С сайта INT4 гена *Nrampl* и гомозигота по аллелю Т сайта +874 гена *INFG* достоверно чаще встречаются у здорового контингента европейской части России по сравнению с больными ТБ детьми и подростками, а гомозигота по аллелю А сайта +874 гена *INFG* достоверно чаще встречается у больных ТБ детей и подростков европейской популяции по сравнению с не болеющими ТБ [81]. Имеющиеся на сегодняшний день данные о фенотипическом проявлении полиморфных вариантов генов носят противоречивый характер и не позволяют сделать однозначных выводов об их вкладе в развитие инфекционных заболеваний [372; 445]. Совместное использование молекулярно-генетических, эпидемиологических и биоинформационных подходов для оценки функциональной значимости полиморфных вариантов генов позволяет обеспечить высокую воспроизводимость и точность полученных ассоциаций между генотипами и заболеванием. В исследовании Д. С. Ожеговой (2009) были выбраны функционально значимые полиморфные варианты С-2508Т гена *MCP1*, Т-1488С гена *IFNG*, G-1704del гена *IFNGR2* с помощью биоинформационной программы MatInspector: уровень экспрессии генов по этим полиморфным вариантам существенно меняется в зависимости от генотипа. Было установлено, что у носителей одних и тех же генотипов гена *MCP1* по исследуемым полиморфизмам разные виды стимуляторов с неизменной концентрацией вызывали разные экспрессионные ответы в культурах клеток. Так гомозиготные генотипы -2508СС и -2508ТТ гена обладали протективной ролью в развитие ТБ. Также было установлено, что аллель -1488С гена *IFNG* играет протективную роль в развитии иммунитета против МБТ [72]. Поэтому данные о функциональной значимости

полиморфных вариантов промоторной области генов *MCPI*, *IFNG* и *IFNGR2* могут служить основой для дальнейшего изучения их ассоциации с риском развития внутриклеточных инфекционных заболеваний.

1.3. Методы выявления и диагностики ЛТИ (специфические антигены)

В то время как у взрослых ТБ развивается обычно из-за реактивации, педиатрический ТБ обычно представляет собой первичное заболевание. Кроме того, существуют значительные различия в иммунных реакциях между взрослыми и детьми. Полученные результаты свидетельствуют о нетипичном клиническом проявлении ТБ у детей с малочисленными классическими признаками и симптомами, что приводит к значительным трудностям в постановке диагноза [141]. У детей младшего возраста ТБ часто генерализованный и может быстро прогрессировать в начале жизни, пока иммунная система только формируется [137]. Диагностическая задержка быстро приводит к повышенной заболеваемости и смертности, поэтому экспресс-диагностика становится особенно важной. Тем не менее различия в проявлении заболевания у детей и взрослых приводит к снижению чувствительности диагностических тестов ТБ. Например, полостные заболевания редко встречаются у детей, в то время как до 30% имеют внелегочные проявления, свидетельствующие о распространении инфекции на ранних стадиях заболевания [137]. Микроскопия мокроты на МБТ, наиболее частый метод выявления ТБ среди взрослых (до 50%), составляет от 10 до 15%, а часто менее, чем 10%, положительных результатов у детей при развитии ТБ [140; 187]. Даже метод посева, золотой стандарт для взрослых, обнаруживает максимум от 30 до 40% случаев ТБ у детей, а также в большинстве случаев уровень обнаружения ниже 20% [140; 187; 207]. Недавнее исследование, оценивающее обнаружение нуклеиновой кислоты одобренного ВОЗ теста Xpert MTB/RIF (Cepheid, CA), у южноафриканских детей продемонстрировало повышенную чувствительность (13%) этого экспресс-метода по сравнению с микроскопией мокроты (6%) [140]. Еще больше осложняет дело младший возраст детей: они

часто не в состоянии предоставить образец мокроты [237]. Альтернативными материалами могут быть, например, индуцированная мокрота или желудочное содержимое, что еще труднее собрать, при этом методы не имеют высокой чувствительности [237]. Поэтому оптимальный диагностический тест для педиатрического ТБ должен обеспечивать быстрые результаты и использовать легкодоступные образцы независимо от места заболевания, такие как кровь или моча.

Усиления мощности системных иммунных реакций потенциально может обнаружить инфекцию при низком пороге антигенной нагрузки и даже удаленных от места инфекции. Анализы, которые обнаруживают туберкулезную инфекцию путем измерения IFN- γ -циркулирующих лимфоцитов в ответ на специфические антигены (IGRA), являются более точными, чем TCT [301]. Тем не менее, они требуют культивирования клеток, что не позволяет их использовать в качестве рутинных методов, в большинстве случаев из-за ограниченных ресурсов. Значение тестов по высвобождению IFN- γ в выявлении ЛТИ и ТБ у детей было недавно рассмотрено [417]. По сравнению с TCT, IGRA показывают подобную чувствительность в выявлении ТБ у детей (от 70 до 90%) [181]. Тем не менее чувствительность IGRA для ТБ уменьшается в странах с низким уровнем дохода (от 40 до 80%); данные несоответствия до сих пор не объяснены [181]. Исследования показывают пониженную чувствительность и более высокий уровень неопределенных IGRA у детей в возрасте до 5 лет [300; 416]. Недостаточно данных, чтобы адекватно оценить производительность IGRA по сравнению с TCT у детей младше 5 лет, однако недавнее исследование показало, что продукция IFN- γ у маленьких детей приводит к немного большей чувствительности IGRA по сравнению с TCT [299]. Что наиболее важно, так же, как и у взрослых, ни TCT, ни IGRA не может отличить ТБ от бессимптомного состояния инфекции [315; 338].

Серологические реакции на антигены МБТ у детей широко варьируют при чувствительности и специфичности в пределах от 14 до 85% и от 40 до 100% соответственно. Эта широкая изменчивость обусловлена несколькими факторами,

в том числе детским возрастом, который оказывает наиболее сильное влияние на ответы АТ, при этом в исследовании результаты оценивались независимо от антигена. До тех пор пока оценивать и интегрировать основные различия в иммунных реакциях и патофизиологии ТБ между взрослыми и детьми не будут, потенциал серодиагностики в педиатрии будет оставаться неопределенным [141]. При интерпретации серологических данных у детей полезно сначала понять, как развивается их иммунная система. Некоторые из проблем в педиатрии серологических исследований можно объяснить медленным развитием гуморальных иммунных реакций у младенцев и детей младшего возраста [367; 410]. Подтверждающие данные замедленного гуморального иммунного ответа исходят из данных вакцинации детей [204; 409; 481].

Важной вехой в современной истории изучения ТБ стало окончание секвенирования генома МБТ [195; 386]. Для установления полной нуклеотидной последовательности был выбран хорошо изученный лабораторный штамм МБТ H37Rv. На настоящий момент в геноме МБТ длиной 4411532 п.о. насчитывают 4012 генов, 7 псевдогенов, 48 генов стабильных РНК и 25 генов малых РНК (*M. tuberculosis* annotation, release R21, <http://tuberculist.epfl.ch/>). Несомненный интерес представляет собой тот факт, что геном МБТ богат IS-элементами. Предполагается, что различающаяся функциональная активность IS-элементов может являться причиной различий в экспрессии некоторых генов у ряда штаммов МБТ. Примерно 4% генома участвует в кодировании белков двух родственных семейств PE и PPE, характерных только для МБТ [154; 163; 195; 390]. Аннотирование генома МБТ штамма H37Rv показало, что он содержит 3995 открытых рамок трансляции (ОРТ), но лишь для 52% из них удалось предсказать функциональную активность [386]. Все выявленные гены получили порядковые номера, следующие за аббревиатурой Rv. Анализ протеома МБТ с применением методов двумерного электрофореза в сочетании с MALDI-MS фингерпринтингом [178] позволил выявить не менее 1800 клеточных и 800 секретируемых белков. По-видимому, именно среди секреторных белков в первую очередь следует искать антигены, перспективные для создания новых вакцин и диагностических

тестов [177]. 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 и от течения заболевания [311].

Семейство ESAT6. К семейству ESAT6 относят низкомолекулярные ранние секретируемые белки, которые кодируются более чем 20 генами [251]. К их числу относят не только собственно ESAT6 (синонимы: *esxA*, Rv3875, MT3989, MTV027.10), но и белки, кодируемые рамками Rv0287, Rv0288 (TB10.4), Rv2346с, Rv2347с, Rv3619с, Rv3620с, Rv3890с (Mb3919с), Rv3905с (Mb3935с) и CFP10 (Rv3874) [251; 415], по нуклеотидным последовательностям которых между *M. bovis* и *M. tuberculosis* наблюдаются различия. Белки семейства высокоиммуногенны и специфичны [177]. По уровню синтеза IFN- γ мононуклеарными клетками периферийной крови доноров в ответ на их контакт с соответствующими антигенами наибольшую иммуногенность демонстрируют TB10.4 > CFP10, $\approx$ ESAT6. Два из членов семейства – ESAT6, CFP10 – кодируются *esx-lhr*-опероном в RD1-области генома МБТ и являются иммунодоминантными Т-клеточными антигенами [376]. Функция всех названных белков пока неизвестна, но они, как экспериментально доказано, опознаются Th1-клетками [347]. Был проведен сравнительный анализ геномов *M. tuberculosis* и *M. bovis*, что позволило выявить в геноме МБТ уникальную область, кодирующую синтез двух ранних секреторных белков ESAT6 (early secreted antigenic target) и CFP10 (culture filtrate protein). Установлено, что они являются одними из ключевых молекул, определяющих вирулентные свойства МБТ. Также было установлено, что эти белки формируют стойкий ответ иммунной системы, что важно для диагностики ТБ и относятся к факторам, которые оказывают непосредственное воздействие на организм хозяина с целью подавления защитных механизмов. К таким модуляторам иммунного ответа в первую очередь можно отнести белок ESAT6

[210; 382], кодируемый геном *esx*. ESAT6 выступает в качестве одного из ключевых факторов иммунной модуляции, предполагается, что он участвует в лизисе мембран фаголизосомы и внешней мембраны макрофагов и тем самым способствует распространению микобактерий от одной клетки хозяина к другой [210; 226; 375]. Экспрессия генов кластера *esx* *in vivo* находится под постоянным контролем и может быть как повышена, так и понижена в зависимости от условий [256; 379; 394; 449].

Другой важной системой модуляции иммунного ответа является экспрессия генов белков семейства PE/PPE, обладающих иммуногенными свойствами [162; 390; 403]. Несмотря на то, что конкретная функциональная активность белков этого семейства не ясна, тот факт, что они являются уникальными для МБТ, указывает на их важность [154; 163; 195; 390].

Кроме того, было показано, что ряд других белков, которые относят к латентным (Rv0079, Rv1737c, Rv2389c, Rv2031c и Rv2628c), индуцируют сильную стимуляцию иммунных реакций клеточного Th1-типа [283].

Дополнительный источник перспективных антигенов появился после сравнительного анализа геномов *M. tuberculosis*, *M. bovis* и *M. bovis* БЦЖ, в результате которого были выявлены области, присутствующие только у *M. tuberculosis* и содержащие открытые рамки считывания [289]. Эти области получили название районов различий – RD (region of difference). Среди белков, кодируемых RD, наряду с уже идентифицированными ESAT6 и CFP10 могут оказаться и новые белки с высокой иммунологической реактивностью, перспективные в качестве компонентов субъединичных вакцин или реагентов для диагностики ТБ. Суммарно во всех RD закодировано до 100 белков [346; 348].

Сравнительный генетический анализ лабораторных вирулентных штаммов МБТ и клинических изолятов МБТ позволил обнаружить протяженные RD1–RD16 хромосомные участки, утраченные в процессе длительного культивирования вакцинного штамма БЦЖ [323]. Большинство белков, кодируемых утраченными областями, связано с патогенностью и вирулентностью МБТ [340]. Наряду с этим белки RD1-области играют исключительно важную

роль в процессах формирования протективного иммунитета [345]. К последним, в частности, относятся и ранний секреторный белок ESAT6 (Early Secreted Antigen Target, 9,8 КДа) и два других белка этого семейства – Rv3874 (CFP10) и Rv0288 (TB10.4), – которые распознаются на ранней стадии туберкулезной инфекции и способствуют пролиферации лимфоцитов, ответственных за продукцию IFN- γ – основного фактора протективного иммунитета [227].

Наиболее иммунологически реактивные из них, как было указано ранее, могли бы быть хорошими кандидатами как для создания вакцин, так и для разработки специфических тест-систем для выявления ТБ. Одними из направлений изучения белков в этом аспекте являются получение их рекомбинантных аналогов или перекрывающихся синтетических пептидов и изучение их серологической и Th1-клеточной реактивности. К числу антигенов, перспективных для создания специфичных диагностикумов в низкоэндемичных районах и кандидатных вакцин, относятся ORF14, ESAT6, присутствующие во всех вирулентных штаммах МБТ и определяющие степень вирулентности [348; 376], а также CFP10, PE, PPE. Тест (IGRA) с использованием белков, кодируемых в RD1-области, показал обнадеживающие результаты для диагностики МБТ-инфекции с преимуществом для пациента, так как требуется только один визит, при этом тест обладал более высокой чувствительностью по сравнению с ТСТ и не зависел от предварительной вакцинации БЦЖ [360]. Это было сочтено важным шагом вперед в последнее десятилетие [366].

На основе метода ELISA был разработан T-SPOT ТБ (с использованием белков ESAT6 и CFP10), который основан на методе ELISPOT для диагностики ТБ *in vitro* и в настоящее время зарегистрирован в РФ с 2012 г. (рег. УД. № ФСЗ 2012/648). Данный тест является высокоинформативным в диагностике туберкулезной инфекции и рекомендован для диагностики ЛТИ и уточнения диагноза «туберкулез» [90; 203], а также является методом выбора при наличии ВИЧ-инфекции [303]. Как показали исследования, эти тесты менее подвержены воздействию иммунного статуса испытуемого человека [216].

Еще один тест для диагностики туберкулеза *in vitro* – квантифероновый тест (КФТ) – в своем составе имеет белки в виде гибрида ESAT6-CFP10, также считается высокоинформативным в диагностике туберкулезной инфекции и рекомендован для диагностики ЛТИ и уточнения диагноза «туберкулез» [21; 53; 90; 171; 203]. Согласно полученным данным, тест КФТ наиболее информативен для выявления инфицирования МБТ (чувствительность – 64%, специфичность – 89%). Очевидным недостатком данного метода является то, что он не позволяет дифференцировать активную и латентную МБТ-инфекцию [107]. Обобщенные аналитические данные свидетельствуют о том, что при обследовании вакцинированных лиц интерфероновые тесты обладают высокой специфичностью, достигающей 99%, при этом чувствительность выявления больных ТБ составляет лишь 78% [42; 338; 359].

В настоящее время в качестве перспективных для специфической диагностики ТБ рассматриваются белки, закодированные в RD5 (Rv3117-Rv3121), они также были рекомбинированы и оценены иммуноферментным анализом на реактивность антител [287]. Результаты выявили два иммуногенных антигена – Rv3117 и Rv3120; оба имели статистически значимые различия между иммунным ответом здоровых и больных ТБ ($p < 0,05$). По сравнению с ответом на стимуляцию ESAT6 (чувствительность – 21,7%, специфичность – 90,6%) были достигнуты более высокие результаты чувствительности и специфичности (Rv3117: чувствительность – 25%, специфичность – 96,9%; Rv3120: чувствительность – 31,7%, специфичность – 96,9%). Таким образом, результаты данного исследования подчеркнули иммуноспецифический характер белков Rv3117 и Rv3120 и позволили говорить о возможности их использования в серодиагностике ТБ [287]. Следует отметить, что в ряде исследований белок ESAT6 не показал большей иммуногенности в сравнении с туберкулином при довольно высоком разбросе значений концентрации IFN- γ в супернатанте, возможно, это говорит о значимых различиях в Т-клеточном иммунном ответе у пациентов с активным ТБ [43].

Другие семейства. CFP32 (Rv0577) – секретируемый белок, предположительно, глиоксилаза, с молекулярной массой 32 кДа, который присутствует только у МБТ туберкулезного комплекса (МТК). Первичная структура CFP32 одинакова у всех представителей комплекса. При секвенировании ПЦР-фрагментов соответствующего гена какого-либо полиморфизма не обнаружено. При культивировании МБТ белок детектируется иммуноблоттингом в культуральной жидкости и клеточных цитозольных компартментах. По результатам иммуноферментного анализа (ИФА) у 32% больных легочной формой ТБ в сыворотке обнаруживаются антитела против CFP32, а сам белок выявляется в сыворотке 56% больных. Уровень CFP32 в сыворотке коррелирует с концентрацией в ней IL-10 (иммуносупрессивного цитокина, предположительно, играющего важную роль в прогрессировании заболевания) и не показывает корреляции с уровнем IFN- γ – ключевого фактора при формировании протективного иммунитета [433]. Белок перспективен как для использования в качестве мишени противотуберкулезных лекарственных средств, так и для диагностики заболевания, выступая в качестве иммунодоминантного антигена Rv0577 [441].

Антигенный комплекс 85. Среди белков, секретируемых МБТ, а также в клеточной оболочке бактерии были обнаружены белки трехкомпонентного антигенного комплекса Ag85 в составе Ag85A, Ag85B и Ag85C [349; 350; 399]. Все они обладают муколил-трансферазной активностью и катализируют биосинтез наиболее распространенных гликолипидов клеточной стенки [259; 389], в том числе и вирулентного корд-фактора [434]. Белки комплекса Ag85 обладают молекулярной массой, составляющей 30–32 кДа [191; 311; 402]. Показано, что рекомбинантный антиген 85A обеспечивает протективный иммунитет, и некоторые из вариантов субъединичных вакцин на его основе уже находятся на стадии клинических испытаний в Африке [136; 161]. Rv3804c (Ag85a, секретируемый антиген 85A. fbpA. MPT59) – секретируемый антиген МБТ, экспрессируется на ранних стадиях инфекционного процесса. Отвечает за высокое сродство МБТ к фибринэктину. Играет роль в синтезе клеточной стенки.

Обладает миколитрансферазной активностью в биосинтезе димиколата тригалоэзы [399]. Экспрессируется как МБТ, БЦЖ, так и атипичными микобактериями. Важное наблюдение, отмечено достоверное снижение иммунореактивности по отношению к белку 85а у пациентов группы риска ЛУ ТБ [43]. Тем не менее, как и с ТСТ, эти анализы не проводят различия между МБТ-инфекцией и активным ТБ [313].

Перспективный белок – **Rv2660с**, ген которого кодируется в RD11 области генома МБТ, и его активная экспрессия отмечена в латентной фазе инфекции [134]. Входит в состав многоступенчатой вакцины H56, которая, как показали исследования, усиливала защитные эффекты БЦЖ против активного ТБ и реактивации ЛТИ [355].

Идентификация антигенов, специфичных для МБТ и замены очищенного белкового производного, остается основным международным исследовательским приоритетом. Мета-анализ, опубликованный в 2016 г., показал отсутствие золотого стандарта в иммунодиагностике туберкулезной инфекции и рекомендовал рассмотреть возможность увеличить чувствительность тестов для дифференциальной диагностики ЛТИ и активной за счет добавления специфических белков в антигенный коктейль [436].

Таким образом, во фтизиатрии большое значение имеют задачи, для решения которых потенциально могут быть использованы биомаркеры: раннее выявление инфицирования МБТ и больных с активной формой ТБ, а также дифференциальная диагностика активной и латентной МБТ-инфекции. Анализ данных литературы позволяет предположить, что для быстрой диагностики ТБ могут иметь значение такие биомаркеры, как антиген-индуцированные IFN- γ .

Резюме:

Анализ современной ситуации по туберкулезной инфекции у детей показал, что сохраняются нерешенные вопросы иммунопатогенеза ТБ, проблема ранней диагностики с целью определения стадии инфекции (активная или латентная). Учитывая вышеперечисленное, для лучшего понимания патогенеза ТБ, решения

проблемы ранней и дифференциальной диагностики туберкулезной инфекции у детей, направленно наше исследование.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Дизайн исследования, критерии включения и исключения из исследования

Диссертационная работа выполнена в ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет Минздрава России», на кафедре педиатрии ДПО. Клиническая часть работы проведена с 2014 по 2017 гг. 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 данного исследования получено разрешение этического комитета Омской государственной медицинской академии (протокол № 51 от 10.10.2012). Для участия детей в исследовании от родителей или их законных представителей было получено добровольное информированное согласие.

В соответствии с поставленной целью и задачами проведено проспективное, поперечное исследование 310 детей, которые были разделены на три группы в зависимости от степени выраженности туберкулезной инфекции:

- 1-я – 110 детей с установленным диагнозом туберкулез (группа «ТБ»),
- 2-я – 156 детей с латентной туберкулезной инфекцией (группа «ЛТИ»),
- 3-я – 44 ребенка, не инфицированных МБТ (группа «НТ»).

Дополнительно из 1-й группы было выделено две подгруппы: 1-я – 86 детей с первичными формами туберкулеза (группа «ТБ1») и 2-я – 24 ребенка с вторичными формами туберкулеза (группа «ТБ2»).

Дополнительно из 2-й группы было выделено две подгруппы: 1-я – 75 детей в раннем периоде первичной туберкулезной инфекции (группа «РПТИ») и 2-я – 81 ребенок, инфицированный МБТ более года (группа «Т»).

Дополнительно из 3-й группы было выделено две подгруппы: 1-я – 21 ребенок с поствакцинальной аллергией (группа «ПВА») и 2-я – 23 ребенка с положительной туберкулиновой анергией (группа «ПТА»).

Критерии включения детей в 1-ю группу:

1. Наличие письменного информированного согласия пациента или его законных представителей на участие в исследовании.
2. Возраст до 18 лет включительно.
3. Установленный диагноз «туберкулез».

Критерии включения детей во 2-ю группу:

1. Наличие письменного информированного согласия пациента или его законных представителей на участие в исследовании.
2. Возраст до 18 лет включительно.
3. Исключение диагноза «туберкулез».
4. Инфицирование МБТ по результатам туберкулинодиагностики (Приказ МЗ РФ № 109, от 21.03.2003, приложение № 4).

Критерии включения детей в 3-ю группу:

1. Наличие письменного информированного согласия пациента или его законных представителей на участие в исследовании.
2. Возраст до 18 лет включительно.
3. Исключение диагноза «туберкулез».
4. Исключение инфицирование МБТ по результатам туберкулинодиагностики (Приказ МЗ РФ № 109, от 21.03.2003, приложение № 4).

Критерии исключения пациентов из исследования:

1. Отказ пациента или законного представителя от дальнейшего участия в исследовании.
2. Возраст старше 18 лет.

Из общего числа (310) обследованных детей всем были проведены специфические иммунологические исследования, из них у 169 детей – молекулярно-генетические (для проведения исследования дети были разделены на основную группу, которую составил 81 ребенок, больной ТБ, и на контрольную – 88 детей без ТБ).

Размер выборки пациентов, минимально 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.

Дизайн исследования представлен на рисунке 2.1.

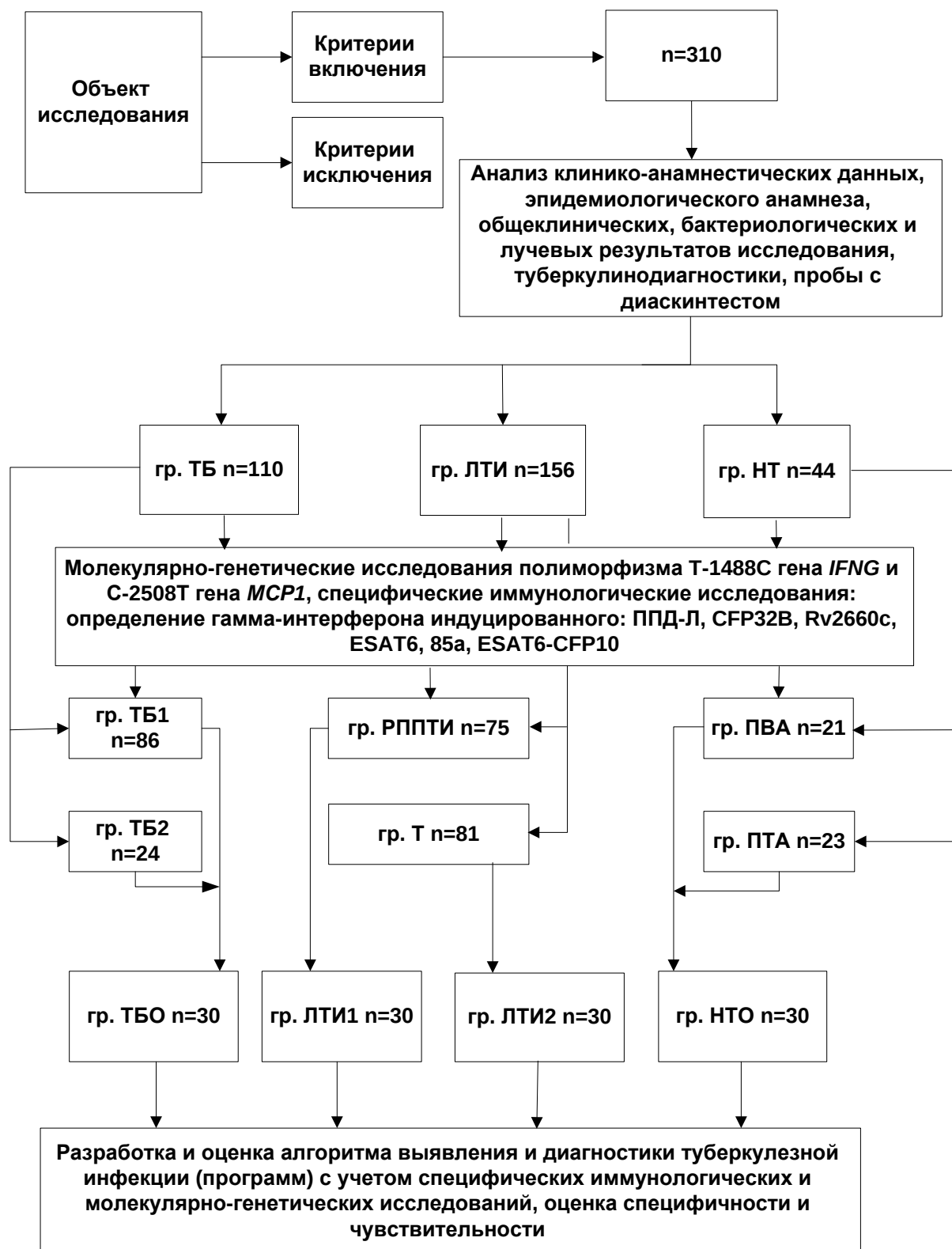


Рисунок 2.1 - Дизайн исследования

2.2 Клиническая характеристика детей, включенных в исследование

В группе «ТБ» было обследовано 110 детей, средний возраст составил $9,5 \pm 0,5$ лет (рис. 2.2).

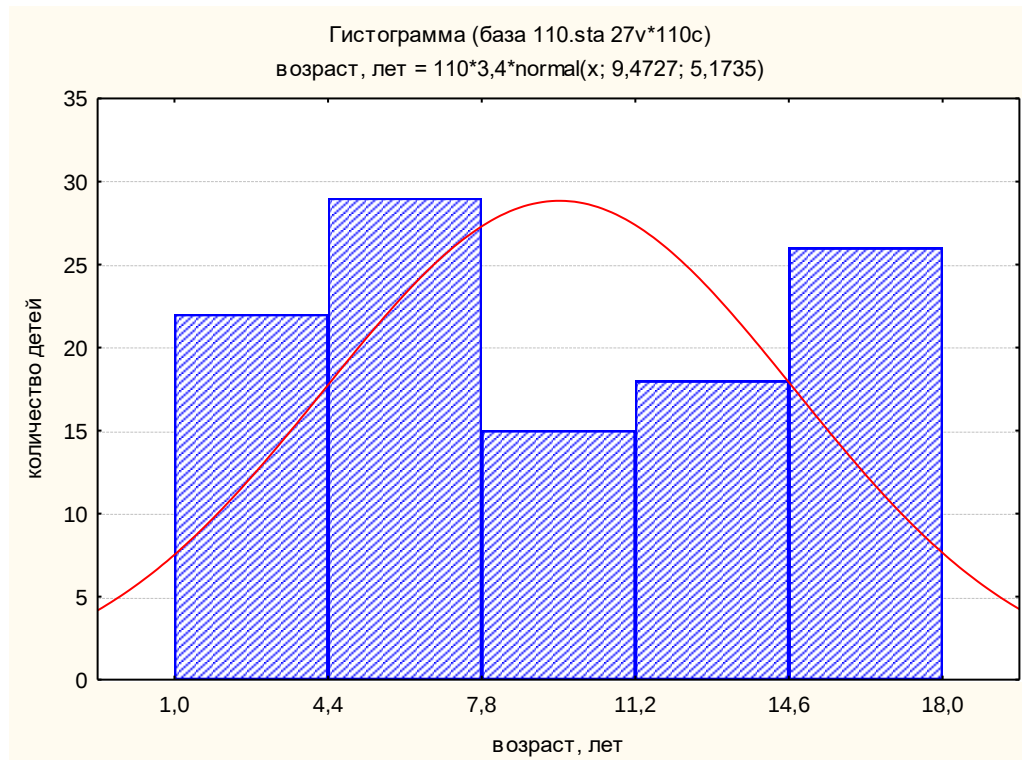


Рисунок 2.2 – Распределение по возрасту детей, больных ТБ

Из рисунка 2.2 следует, что в обследуемой группе больных ТБ каждый второй ребенок (51; 46,6%) был в возрасте до 8 лет, каждый четвертый (26; 23,6%) – подросткового возраста (15-18 лет).

По полу пациенты распределялись следующим образом: 60 (54,5 %) мальчиков, 50 (45,5 %) девочек. 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 $2,8 \pm 0,5$ (95% ДИ 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 туберкулеза 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 туберкулезом, 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 аллергеном туберкулезным рекомбинантным (АТР, CFP10-ESAT6 0,2 мкг, препарат ДИАСКИНТЕСТ®) средний размер инфильтрата составил $14,95 \pm 0,5$ мм (95% ДИ 13,9-16,0 мм). Выраженность реакций на специфические аллергены представлена в таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Частота регистрации положительных, сомнительных и отрицательных реакций на ППД-Л и АТР у детей группы «ТБ»

Реакции	на ППД-Л, n=110	на АТР, n=109
	абс (%)	абс (%)
отрицательные	2(1,8)	6(5,5)
сомнительные	3(2,7)	0
Положительные:	105(95,5)	103(94,5)
-нормергические	78(74,3)	29(28,2)
-гиперергические	27(25,7)	74(71,8)

Из таблицы 2.1 следует, что среди детей, больных ТБ, в основном регистрировали положительные нормергические реакции на ППД-Л (на 2 ТЕ) (n=110; 70,9%) и гиперергические (n=109; 67,9%) – на АТР.

Диагноз «туберкулез» устанавливался по результатам комплексного обследования центральной врачебно-контрольной комиссией (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) – туберкулез 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 туберкулез 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 к основным противотуберкулезным препаратам (H, R, S, Z, E). Клиническая характеристика детей группы «ТБ» представлена в таблице 2.2.

Таблица 2.2 – Распределение обследованных детей по возрасту и клиническим формам ТБ

Клинические формы туберкулеза	1-6 лет, абс	7-14 лет, абс	15-18 лет, абс	Всего	
				абс	%
1. Туберкулез внутригрудных лимфатических узлов	21	24	1	46	41,8
Локализация процесса:					
- двусторонняя	12	11	0	23	
- правосторонняя	7	10	1	18	
- левосторонняя	2	3	0	5	
Фаза:					
- инфильтрации	14	10	1	25	
- кальцинации	7	14	0	21	
Бактериовыделение:					
МБТ-	21	24	1	46	
Осложнения туберкулеза:					
- ателектаз	1	0	0	1	
- легочная диссеминация	1	0	0	1	
Сочетанное поражение туберкулеза:					
- бронхов (левый верхнедолевой)	1	0	0	1	
- периферических лимфатических узлов	1	0	0	1	
2. Первичный туберкулезный комплекс	16	20	2	38	34,5
Локализация процесса:					
- двусторонняя	3	7	2	12	
- правосторонняя	11	8	0	19	
- левосторонняя	2	5	0	7	
Поражение более 2-х сегментов	3	4	0	7	
Фаза:					
- инфильтрации	14	12	2	28	
- распада	0	2	0	2	
- кальцинации	2	6	0	8	
Бактериовыделение:					
МБТ-	16	19	2	37	
МБТ+	0	1	0	1	
Чувствительность к противотуберкулезным препаратам:					
- сохранена	-	1	-	1	
- лекарственная устойчивость	-	0	-	0	
Осложнения туберкулеза:					
- экссудативный плеврит	0	0	1	1	
Сочетанное поражение туберкулеза:					
- периферических лимфатических узлов	1	0	0	1	
- плечевой кости (справа)	1	0	0	1	

Продолжение таблицы 2.2

3. Очаговый туберкулез легких	0	0	1	1	0,9
Локализация процесса: правосторонняя	0	0	1	1	
Фаза: инфильтрации	0	0	1	1	
Бактериовыделение: МБТ-	0	0	1	1	
4. Инфильтративный туберкулез легких	0	1	22	23	20,9
Локализация процесса:					
- двусторонняя	0	0	8	8	
- правосторонняя	0	1	11	12	
- левосторонняя	0	0	3	3	
Поражение:					
- 1-2 сегментов	0	1	12	13	
- 1-2 доли	0	0	4	4	
- более 2-х долей	0	0	6	6	
Фаза:					
- инфильтрации	0	1	11	12	
- распада	0	0	3	3	
- распада и обсеменения	0	0	6	6	
- обсеменения	0	0	1	1	
- рассасывания и уплотнения	0	0	1	1	
Бактериовыделение:					
МБТ-	0	1	12	13	
МБТ+	0	0	10	10	
Чувствительность к противотуберкулезным препаратам:					
- сохранена	-	-	5	5	
- лекарственная устойчивость:	-	-	5	5	
- ЛУ	-	-	1	1	
- МЛУ	-	-	4	4	
Осложнения туберкулеза:					
- кровохарканье	0	0	1	1	
Сочетанное поражение туберкулеза:					
- кишечника	0	0	1	1	
5. Диссеминированный туберкулез легких	1	0	0	1	0,9
Фаза: инфильтрации	1	0	0	1	
Бактериовыделение: МБТ+ (МЛУ)	1	0	0	1	
6. Туберкулезный плеврит	1	0	0	1	0,9
Локализация процесса: правосторонняя	1	0	0	1	
Бактериовыделение: МБТ-	1	0	0	1	
Всего	39	45	26	110	100

Из таблицы 2.2 следует, что 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 бактериовыделением, что также свидетельствовало о поздней диагностике ТБ. В целом выявленная патология отражала современную структуру заболеваемости ТБ детей [3].

Данные о противотуберкулезной вакцинации имелись у всех заболевших детей. Среди них только двое не были вакцинированы БЦЖ. Среди вакцинированных БЦЖ (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 составил $6,6 \pm 0,3$ лет (рисунок 2.3).

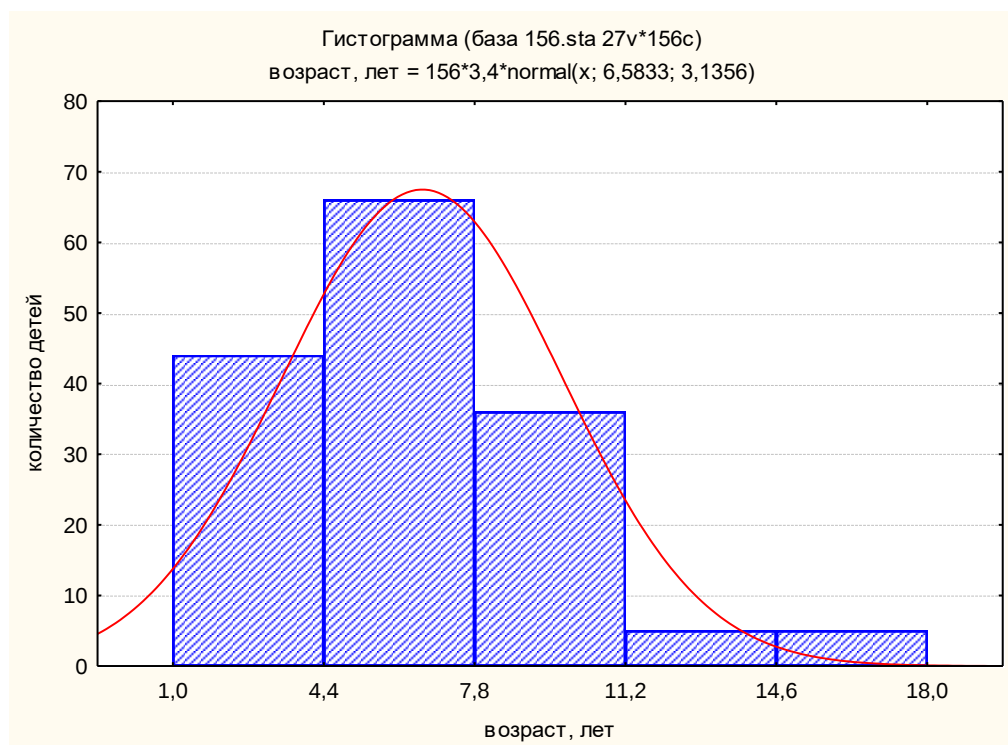


Рисунок 2.3 – Распределение по возрасту детей с ЛТИ

Из рисунка 2.3 следует, что в обследуемой группе «ЛТИ» большая часть детей (110; 70,5%) была в возрасте до 8 лет.

По полу дети распределялись следующим образом: 87 (57,1 %) мальчиков, 67 (42,9 %) девочек, в данной группе 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; Латентная туберкулезная инфекция, клинические рекомендации, 2014, 2015). По результатам обследования у 75 детей (48,1%) установили РППТИ и у 81 ребенка (51,9%) – ранее инфицирование МБТ.

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 установлено бактериовыделение и в двух случаях ($n=14$; 14,3%) – МЛУ.

По результатам 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 данным туберкулинодиагностики (проба Манту с 2ТЕ ППД-Л), средний размер инфильтрата составил $10,3 \pm 0,3$ мм (ДИ 95% 9,7-10,9 мм), по результатам пробы с АТР – $1,9 \pm 0,4$ мм (ДИ 95% 1,2-2,65 мм). Выраженность реакций на специфические аллергены представлена в таблице 2.3.

Таблица 2.3 – Частота регистрации положительных, сомнительных и отрицательных реакций на ППД-Л и АТР у детей группы «ЛТИ»

Реакции	на ППД-Л, $n=156$	на АТР, $n=156$
	абс (%)	абс (%)
отрицательные	0	127(81,4)
сомнительные	1(0,6)	1(0,6)
Положительные:	155(99,4)	28(18)
-нормергические	151(97,4)	20(71,4)
-гиперергические	4(2,6)	8(28,6)

Из таблицы 2.3 следует, что среди детей с ЛТИ на ППД-Л (на 2ТЕ) 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%). По результатам оценки результативности вакцинации установили, что она оказалась эффективной у большинства детей – 97 (62,6%).

В группе не инфицированных МБТ (НТ) обследовано 44 ребенка, средний возраст составил $3,1 \pm 0,4$ года (рис. 2.4).

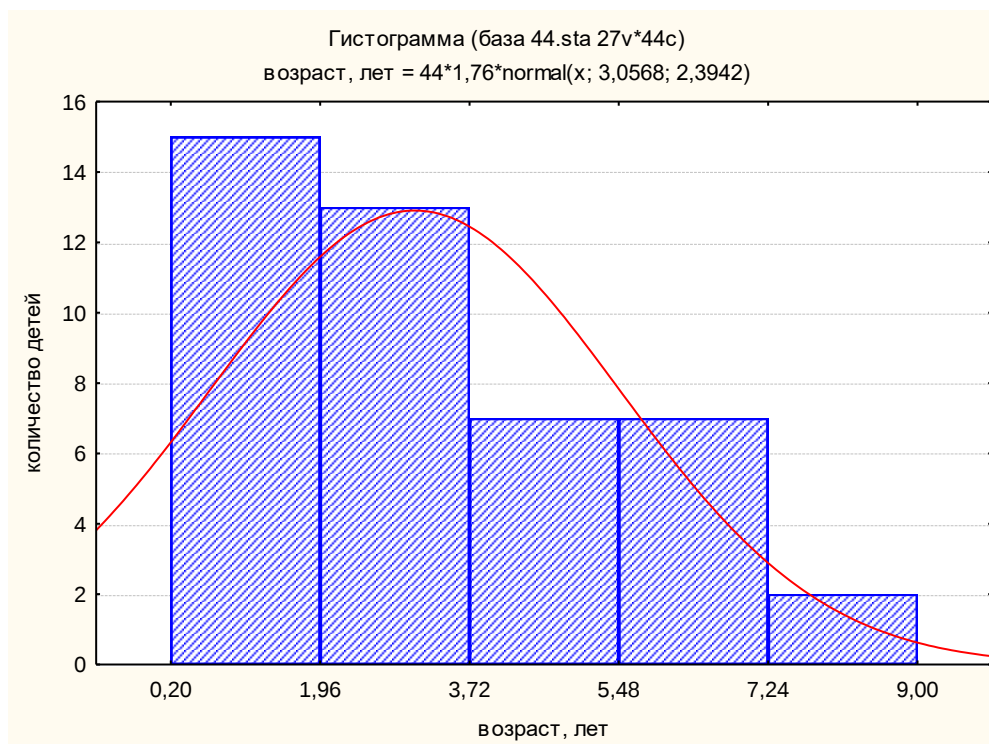


Рисунок 2.4 – Распределение по возрасту детей, не инфицированных МБТ

Из рисунка 2.4 следует, что большая часть (42; 95,5%) детей группы «НТ» была до 8 лет, из них мальчиков было больше (28; 63,6%), чем девочек (16; 36,4%) ($\chi^2 = 5,500$; $p=0,019$).

Среди детей группы «НТ» вакцинировано против ТБ 36 детей (81,8%), в связи с отказом не было вакцинировано 8 детей (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 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 с АТР у всех (100%) установили отрицательные реакции.

Таким образом, группы наблюдения отражали закономерности всей совокупности, т.е. были репрезентативны и являлись достаточными для получения достоверных результатов наших исследований.

2.3. Методы исследования

У всех пациентов проводилась комплексная оценка состояния здоровья. Обследование включало стандартные общеклинические, клинко-рентгенологические и лабораторные исследования [68; 124], в том числе иммунологические и молекулярно-генетические исследования, которые проводились при поступлении в стационар и взятии на учет в КППД, на базе ФБУН «Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора, оно включало: определение уровня иммуноглобулинов (Ig) G, A, M (по методу Manchini и др., 1970) и Ig E (иммуноферментным методом) в сыворотке крови; оценку 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); оценку субпопуляционного состава Т-клеток (CD) с использованием панели моноклональных антител фирмы DAKO (Дания), определение уровня ИФН- γ спонтанного и стимулированного специфическими антигенами (ППД-Л, CFP32В,

Rv2660с, ESAT6, 85а, ESAT6-CFP10) [104], выделение ДНК и генотипирование двух полиморфных маркеров С-2508Т гена *MCP1* и Т-1488С гена *IFNG*.

Специфические антигены ППД-Л, CFP32В, Rv2660с, ESAT6, 85а, ESAT6-CFP10 были выделены в лаборатории трансляционной биомедицины отдела генетики и молекулярной биологии бактерий НИЦ эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи, г. Москва. Для количественного определения 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.). Референсные значения уровень ИФН-γ для специфических антигенов представлены в таблице 2.4.

Таблица 2.4 – Референсные значения уровня ИФН-γ для ППД-Л, CFP32В, Rv2660с, ESAT6, 85а, ESAT6-CFP10

Антиген	отрицательный результат, пг/мл	отрицательный результат, и.с.
ППД-Л	<90	≤1
ESAT6	<150	≤2
Rv2660с	<160	≤2
ESAT6-CFP10	<100	≤1
85а	<85	≤1
CFP32В	<85	≤1

Выделение ДНК из периферической крови проводили согласно инструкции набора «ДНК-кровь» («ТестГен», Россия), с использованием аллель-специфической полимеразной цепной реакции (ПЦР) было проведено генотипирование полиморфных маркеров Т-1488С гена *IFNG* (rs2069705) и С-2508Т гена *MCP1* (rs1024611) (таблица 2.5). Генотипирование проводилось с использованием наборов для ПЦР в модификации FLASH (производитель «ТестГен», Россия) и амплификатора iQ5 (производитель «BioRad», США) согласно инструкциям производителей. Условия амплификации: 1. 95° – 2 мин (1 цикл); 2. 94° – 10 сек, 58° – 1 мин (40 циклов). Определение генотипов проводилось с использованием программного модуля iQ5 «Дискриминация аллелей».

Таблица 2.5 – Характеристика исследуемых полиморфизмов генов *IFNG* и *MCP1*

Ген	Локализация на хромосоме	Полиморфизм	Локализация в гене	Фермент рестрикции
<i>IFNG</i>	12g14	T-1488C	промотор	HpaI
<i>MCP1</i>	17q11.2-q12	C-2508T	5'-UTR	PvuII

Распределение частот генотипов по исследованным локусам проверяли на соответствие закону Харди-Вайнберга. Отклонений распределения наблюдаемых частот генотипов исследуемого полиморфного участка гена *IFNG* (T-1488C) и гена *MCP1* (C-2508T) от равновесия Харди-Вайнберга не наблюдалось.

Оценку чувствительности к туберкулину по пробе Манту с 2ТЕ ППД-Л проводили в динамике и при поступлении. Оценка результатов пробы Манту с 2 ТЕ проводилась по Приказу МЗ РФ от 21.03.2003 № 109. Оценку чувствительности к АТР (Приказ МЗ РФ №855 от 29 октября 2009 г. «О внесении изменений в приложение № 4 к Приказу МЗ РФ от 21.03.2003 № 109») проводили при поступлении в стационар или взятии на учет в КППД.

Результативной вакцинация БЦЖ или БЦЖ-М считалась при наличии рубца 4 мм и более и ПВА.

2.4. Статистические методы исследования

Статистическая обработка данных проводилась на персональном компьютере с использованием программ OpenEpi версия 3, Statistica 6,0 и StatPlus Pro 5.9.8.

Расчет выборки (*n*) был определен в программе OpenEpi версия 3, с учетом численности генеральной совокупности и ожидаемого уровня распространенности изучаемого явления. Размер общей выборки составил 271 человек при минимальном количестве в группе до 12 человек.

Для всех изученных полиморфных вариантов генов в выборках популяционного контроля распределение генотипов проверялось на соблюдение равновесия Харди-Вайнберга ($p^2AA + 2pqAa + q^2aa = 1$).

Определяли среднее арифметическое (M); стандартная ошибка среднего ($\pm SEM$); 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 оценивалась 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 считались статистически достоверными при уровне значимости $p \leq 0,05$. Анализ связи нескольких переменных проводили с помощью подсчета коэффициента корреляции Спирмена (r): принято считать, что при $r \leq 0,25$ – корреляция слабая, $0,25 < r \leq 0,75$ – умеренная, при $r > 0,75$ – сильная. [75; 76; 87; 128]. Для классификации информации при формировании групп по качественному и количественному сходству применяли кластерный анализ, в частности, метод *k-средних* (результаты кластеризации считались успешными, при больших значениях *Between SS*, больших значениях *F*, малых значениях *p*) [128]. Чувствительность и специфичность диагностических тестов с 95% ДИ (CI), а также расчет рисков (коэффициент риска, RR) и отношение шансов (ОШ или OR) (если шанс (риск) был выше 1, то развитие заболевания считалось статистически значимо), в том числе при оценке генетических маркеров, определялись в соответствии с подходами, описанными А. Е. Платоновым (2000) и А. Петри с К. Сэбин (2010) [75; 76].

Теорема Байеса [60] 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 (алгоритмах) для обработки поступающей информации о пациентах с подозрением на ТБ или ЛТИ. Оценивая выбранную модель для компьютерной программы (алгоритма), использовали метод «точек разделения» для расчета порогового уровня принятия решения (в случае превышения порога рисков значения обследуемым может быть рекомендована консультация специалиста). «Точки разделения» для трех программ были получены путем расчета соотносящихся с ними чувствительности, специфичности и прогностичности. Для оценки операционных характеристик Байесовской модели был применен ROC-анализ [87]. Построенная ROC-кривая основана на всех точках-разделения, которые дают уникальную пару значений для чувствительности и специфичности, что позволяет вычерчивать зависимость чувствительности от величины 1 минус специфичность (сравнивая, таким образом, вероятности положительного результата диагностического теста или алгоритма у больных и здоровых пациентов). Два или более теста можно сравнивать путем рассмотрения площади (AUC) под каждой кривой. Согласно шкале значений AUC (табл. 2.6), чем выше показатель, тем более качественная модель.

Таблица 2.6 – Шкала значений AUC

Интервал AUC	Качество модели
0,9-1,0	Отличное
0,8-0,9	Очень хорошее
0,7-0,8	Хорошее
0,6-0,7	Среднее
0,5-0,6	Неудовлетворительное

Таким образом, работа выполнена на достаточном объеме выборке с использованием современных статистических методов.

ГЛАВА 3. ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ ЛАТЕНТНОЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ И ФАКТОРЫ ЕЕ ПРОГРЕССИРОВАНИЯ У ДЕТЕЙ

С целью изучения прогностической ценности факторов риска развития ТБ у детей с ЛТИ провели сравнительный анализ результатов наблюдений за 156 пациентами с ЛТИ (группа «ЛТИ»), 44 – не инфицированными МБТ (группа «НТ») и 110 – больными ТБ детьми (группа «ТБ»). Проанализировали особенности онтогенеза (учитывали биологический и социальный анамнез), физического развития, уровень резистентности организма ребенка, функционального состояния органов и систем, а также наличие или отсутствие хронических заболеваний [84].

3.1. Особенности социального анамнеза при развитии ЛТИ и ее прогрессировании у детей

Дети, инфицированные МБТ, формируют группу риска по ТБ [124], реализация риска, по исследованиям многих авторов, возможна при сочетании медико-биологических и социально-эпидемиологических факторов [40; 78; 93; 105; 116; 124], при этом вклад каждого фактора неравнозначен [59; 123; 124], что требует их дополнительной оценки.

Результаты социального анамнеза позволили выделить социальные факторы риска, которые представлены в таблице 3.1.

Таблица 3.1 – Результаты социального анамнеза в группах сравнения

Данные социального анамнеза	ТБ, n=110	ЛТИ, n=156	НТ, n=44	RR _{ТБ-ЛТИ} , 95%CI	Критерий $\chi^2_{ТБ-ЛТИ}$, p	RR _{ЛТИ-НТ} , 95%CI	Критерий $\chi^2_{ЛТИ-НТ}$, p
	абс(%)	абс(%)	абс(%)				
семья неполная	45(40,9)	19(12,2)	9(20,5)	3,359; 2,084- 5,414	29,14; <0,0000001	0,595; 0,290- 1,222	1,952; 0,081
семья многодетная	37(33,6)	10(6,4)	4(9,1)	5,247; 2,727- 10,1	32,87; <0,0000001	0,705; 0,232- 2,140	0,379; 0,269

Продолжение таблицы 3.1

воспитываются опекунами	16(14,5)	0	0	-	-	-	-
из учреждений социальной защиты	4(3,6)	0	0	-	-	-	-
семья малообеспеченная	56(50,9)	10(6,4)	11(25)	7,942; 4,242- 14,87	68,47; <0,0000001	0,256; 0,117- 0,564	12,62; 0,0002
образование родителей среднее или средне-специальное	164 (94,3) n=174	96(32,8) n=293	59(74,7) n=79	2,877; 2,432- 3,403	167,3; <0,0000001	0,439; 0,356- 0,540	44,99; <0,0000001
занятость матери: не работает	73(71,6) n=102	72(46,2) n=156	20(45,5) n=44	1,551; 1,258- 1,911	16,18; 0,00003	1,015; 0,705- 1,463	0,007; 0,467
занятость отца: не работает	27(37,5) n=72	19(13,9) n=137	3(8,6) n=35	2,704; 1,619- 4,516	15,35; 0,00004	1,618; 0,507- 5,159	0,701; 0,201
в семье злоупотребляют алкоголем или наркотиками	24(21,8)	1(0,6)	1(2,3)	34,040; 4,647- 247,81	33,98; <0,0000001	0,282; 0,018- 4,418	0,923; 0,168
в семье курят	53(48,2)	42(26,9)	12(27,3)	1,790; 1,296- 2,472	12,7; 0,0002	0,987; 0,571- 1,707	0,002; 0,482
жилищно-бытовые условия неудовлетворительные	53(48,2)	6(3,8)	8(18,2)	12,530; 5,583- 28,111	73,47; <0,0000001	0,212; 0,078- 0,577	10,83; 0,0005
ребенок не организован	32(29,1)	30(19,2)	39(88,6)	1,513; 0,980- 2,335	3,509; 0,031	0,217; 0,155- 0,304	73,16; <0,0000001

Как видно из таблицы 3.1, оценивая риски социальных факторов в развитии туберкулеза, установили, что наибольший вклад связан со злоупотреблением в семье алкоголя и употреблением наркотиков (RR 34,04) [124], с безработицей родителей (при этом выше риск, связанный с отцом RR 2,704, чем с матерью RR 1,551) [124]. Не меньший – при неудовлетворительных жилищно-бытовых условиях (RR 12,53) [7; 47; 55; 63; 91; 123], а также при среднем или средне-специальном образовании родителей (RR 2,877) [63; 91; 123], неполной семье (RR 3,359) [55; 91], малообеспеченной семье (RR 7,942) [55; 91; 105; 123], при наличии курящих в семье (RR 1,790) [7; 47; 55], многодетной семье (RR 5,247) [55; 105;

123]. Дополнительно выделили такой социальный фактор риска ТБ, как статус «неорганизованного» ребенка (RR 1,513), что ранее не отмечалось.

При определении рисков инфицирования МБТ, не было установлено связи с социальными факторами, за исключением занятости родителей (отсутствие постоянной работы у отца RR 1,618 и у матери RR 1,015).

3.2. Особенности биологического анамнеза при развитии ЛТИ и ее прогрессировании у детей

По результатам биологического анамнеза (antenatalного и интранатального периодов развития) также были выделены факторы риска, которые представлены в таблице 3.2.

Таблица 3.2 – Результаты антенатального и интранатального периодов развития детей в группах сравнения

Данные биологического анамнеза	ТБ, n=105	ЛТИ, n=156	НТ, n=44	RR _{ТБ-ЛТИ} , 95%CI	Критерий χ^2 ТБ-ЛТИ, p	RR _{ЛТИ - НТ} , 95%CI	Критерий χ^2 ЛТИ-НТ, p
	abc(%)	abc(%)	abc(%)				
Возраст матери младше 18 лет и старше 25 лет	52(49,5)	107 (68,6)	21(47,7)	0,722; 0,579- 0,900	9,582; 0,001	1,437; 1,036- 1,993	6,483; 0,005
<i>Вредные привычки матери:</i>	24(22,9)	5(3,2)	2(4,5)	7,131; 2,810- 18,100	24,54; <0,0000004	0,705; 0,142- 3,511	0,183; 0,335
-курение, n=24	8(33,4)	3(60) n=5	2(100) n=2	-	-	-	-
-злоупотребление алкоголем, n=24	11(45,8)	1(20) n=5	0				
-употребление наркотиков n=24	5(20,8)	1(20) n=5	0				
Наличие хронических заболеваний (экстрагенитальных) у матери	62(59)	98(62,8)	32(72,7)	0,940; 0,770- 1,148	0,377; 0,270	0,864; 0,695- 1,074	1,481; 0,112

Продолжение таблицы 3.2

Патология течения беременности: -токсикозы, угроза прерывания	62(59)	88(56,4)	34(77,3)	1,047; 0,848- 1,292	0,179; 0,336	0,730; 0,591- 0,902	6,279; 0,006
- анемия	17(16,2)	20(12,8)	11(25)	1,263; 0,695- 2,295	0,586; 0,222	0,513; 0,266- 0,988	3,887; 0,024
-инфекции (во время беременности):	19(18,1)	60(38,5)	11(25)	0,471; 0,299- 0,779 (хр.инф 3,467; 1,376- 8,732)	12,33; 0,0002 (7,983; 0,002)	1,538; 0,889- 2,664 (остр.инф 1,692; 0,909- 3,150)	2,716; 0,049 (3,19; 0,037)
ОРВИ	5	53	9				
ВГС	1	4	2				
ВИЧ	3	0					
сифилис	4	0					
туберкулез	6	1					
ВПЧ		1					
ветряная оспа		1					
Патология в период родов (преждевременные, запоздалые, затяжные)	21(20)	23(14,7)	6(13,6)	1,357; 0,793- 2,322	1,237; 0,134	1,081; 0,470- 2,489	0,034; 0,427
Оперативные роды: -кесарево сечение	11(10,5)	21(13,5)	0	0,778; 0,392- 1,546	0,520; 0,235	«неопределенный»	6,618; 0,005
Наследственность по туберкулезу: -отягощена	68(61,8) n=110	12(7,7)	1(2,3)	8,036; 4,576- 14,110	89,87; <0,0000001	3,385; 0,453- 25,320	1,659; 0,099

Из таблицы следует, что в антенатальном периоде основными факторами риска ТБ выступали наличие вредных привычек матери во время беременности (беременность, протекающая на фоне хронической никотиновой интоксикации, злоупотребления алкоголя и употребления внутривенных наркотиков – героина) (RR 7,131), что согласуется с данными Крюковой А. М. (2008) [55], а также патологическое течение беременности, в частности, сохранение активности хронических инфекций (RR 3,467), что ранее не отмечали. А связь с риском ТБ таких факторов, как возраст матери, экстрагенитальные заболевания матери, не установлена, в отличие от представленных ранее результатов ряда исследователей [47; 55; 63]. Оценивая факторы инфицирования МБТ, отмечено, что возраст матери (до 18 лет и старше 25 лет) (RR 1,437), а также перенесенные во время

беременности острые вирусные инфекции (RR 1,692) определились как основные риски в антенатальном периоде.

В интранатальном периоде также выявлены факторы, определяющие риск как ТБ, так и инфицирования МБТ – преждевременные, запоздалые или затяжные роды (RR 1,357 и RR 1,081 соответственно). Оперативные роды достоверно чаще регистрировали среди лиц, инфицированных МБТ ($p=0,005$), что позволило их рассматривать как фактор риска.

Наследственный анамнез, указывающий на заболевание ТБ ближайших родственников, установили как фактор риска и для развития заболевания у детей (RR 8,036) и ЛТИ (RR 3,385). При этом в настоящее время в качестве фактора риска отягощенная по ТБ наследственность не учитывается [124].

Проведенный анализ раннего постнатального периода также позволил выделить факторы риска (табл. 3.3).

Таблица 3.3 – Результаты раннего постнатального периода развития детей в группах сравнения

Данные биологического анамнеза	ТБ, n=110	ЛТИ, n=156	НТ, n=44	RR _{ТБ-ЛТИ} , 95%CI	Критерий $\chi^2_{ТБ-ЛТИ}$, Р	RR _{ЛТИ-НТ} , 95%CI	Критерий $\chi^2_{ЛТИ-НТ}$, Р
	abc(%)	abc(%)	abc(%)				
Состояние здоровья новорожденного: патология при рождении	56(50,9)	98(62,8)	32 (72,7)	0,810; 0,651-1,009	3,755; 0,026	0,864; 0,695-1,074	1,481; 0,112
Недоношенность	14(12,7)	9(5,8)	3(6,8)	2,206; 0,990-4,915	3,954; 0,023	0,846; 0,239-2,992	0,067; 0,398
Перинатальные поражения ЦНС	53(48,2)	69(44,2)	30 (68,2)	1,089; 0,838-1,415	0,406; 0,262	0,649; 0,496-0,848	7,876; 0,0025
Аномалии развития	9(8,2)	15(9,6)	1(2,3)	0,851; 0,386-1,874	0,162; 0,344	4,231; 0,575-31,151	2,514; 0,056
При рождении масса тела до 2500 г	11(10)	9(5,8)	1(2,3)	1,733; 0,744-4,041	1,661; 0,099	2,538; 0,331-19,49	0,883; 0,174
Грудное вскармливание	52(47,3)	116(74,4)	33(75)	0,636; 0,511-0,790	20,34; 0,000003	0,992; 0,817-1,204	0,007; 0,466

Продолжение таблицы 3.3

Раннее начало кормления искусственным питанием	58(52,7)	40(25,6)	11(25)	2,056; 1,493- 2,833	20,34; 0,000003	1,026; 0,576- 1,827	0,007; 0,466
Перенесенные ОРВИ до 1 года	25(22,7)	62(39,7)	12 (27,3)	0,572; 0,389- 0,849	8,487; 0,002	1,457; 0,867- 2,451	2,29; 0,065
Дефицитные состояния до 1 года (ЖДА, рахит, хронические расстройства питания)	15(13,6)	27(17,3)	8(18,2)	0,788; 0,440- 1,410	0,654; 0,209	0,952; 0,466- 1,945	0,018; 0,446
Физическое и нервно-психическое развитие к 1 году жизни с задержкой	11(10)	8(5,1)	1(2,3)	1,95; 0,811- 4,689	2,308; 0,064	2,256; 0,290- 17,560	0,651; 0,210
Профилактические прививки по индивидуальному графику	30(27,3)	47(32,2) n=146	4(11,1) n=36	0,847; 0,576- 1,246	0,722; 0,198	3,219; 1,244- 8,999	77,7; 0,003
Отказ от вакцинации	0	10(6,4)	8(18,2)	0,0	7,327; 0,003	0,353; 0,145- 0,839	5,807; 0,008
Вакцинация: - БЦЖ	96(88,9) n=108	149(96,1) n=155	33 (91,7) n=36	0,925; 0,859- 0,996	5,233; 0,011	1,049; 0,946- 1,163	1,296; 0,128
- БЦЖ-М	12(11,1) n=108	6(3,9) n=155	3(8,3) n=36	2,87; 1,112- 7,412	5,233; 0,011	0,465; 0,122- 1,770	1,296; 0,128
Результативность вакцинации БЦЖ(БЦЖ-М): Рубец 4-10 мм	77(71,3) n=108	107(69) n=155	23 (63,9) n=36	1,033; 0,881- 1,211	0,155; 0,347	1,081; 0,827- 1,412	0,356; 0,276
Инфильтрат 5 и >мм (проба Манту с 2 ТЕ ППД-Л)	31(28,7) n=108	97(62,6) n=155	9(25) n=36	0,459; 0,333- 0,632	29,24; <0,0000001	2,503; 1,403- 4,465	16,71; 0,00002
Низкая результативность вакцинации БЦЖ или БЦЖ-М	77 (71,3) n=108	58(37,4) n=155	27(75) n=36	1,905; 1,505- 2,413	29,24; <0,0000001	0,499; 0,378- 0,659	16,71; 0,00002
Детские инфекции	57(51,8)	80(51,3)	8(18,2)	1,010; 0,798- 1,280	0,007; 0,466	2,821; 1,480- 5,377	15,26; 0,00005
Отягощенный аллергологический анамнез	16(14,5)	67(42,9)	12 (27,3)	0,339; 0,208- 0,552	24,24; 0,0000004	1,575; 0,941- 2,636	3,529; 0,030

Продолжение таблицы 3.3

5 и более эпизодов ОРВИ в год (группа детей с рекуррентными заболеваниями)	21(19,1)	41(26,3)	10 (22,7)	0,726; 0,456- 1,151	1,866; 0,086	1,156; 0,632- 2,117	0,228; 0,316
--	----------	----------	--------------	---------------------------	-----------------	---------------------------	-----------------

В настоящее время факторы, обуславливающие неблагоприятный биологический анамнез в постнатальном периоде, не рассматриваются как возможные риски развития ТБ у детей, это также не отмечено в клинических рекомендациях по ЛТИ [124]. При этом ранее исследователи обращали внимание, что с формированием риска ТБ связаны недоношенность, масса тела при рождении [47; 55], искусственное вскармливание [55]. По нашим данным (таблица 3.3) следует, что в раннем постнатальном периоде выявлено несколько факторов, связанных с риском развития ТБ, таких как недоношенность (RR 2,206), низкая масса тела при рождении (до 2500 г) (RR 1,733) и задержка развития к году (RR 1,95), раннее начало кормления искусственным питанием (RR 2,056). Необходимо отметить, что наличие такой сопутствующей патологии, как частые респираторные вирусные инфекции (формирование группы часто болеющих детей) [15; 55; 58; 124], не нашли подтверждения в нашем исследовании (RR 0,726), в том числе перенесенные ОРВИ до года (RR 0,572). Несмотря на отсутствие связи данных факторов с риском развития ТБ, был установлен риск развития ЛТИ (RR 1,516 и RR 1,457, соответственно). Дополнительно в качестве риска ЛТИ установлены нами аномалии развития (RR 4,231), низкая масса тела при рождении (RR 2,538), задержка физического и нервно-психического развития к концу первого года (RR 2,256), перенесенные детские инфекции (RR 2,821) и отягощенный аллергологический анамнез (RR 1,575).

Оценивая риски профилактических прививок, было установлено, что наличие нарушений календаря (вакцинация по индивидуальному графику) не увеличивало частоту развития ТБ (RR 0,722), но могло повлиять на развитие у детей ЛТИ (RR 3,219).

В качестве специфического фактора риска ТБ рассматривается отсутствие [105; 124] или низкая эффективность вакцинации БЦЖ (БЦЖ-М) [91; 105]. Нами также в качестве риска ТБ подтверждена низкая результативность вакцинации БЦЖ (БЦЖ-М) (RR 1,905) и в качестве более высокого риска установлена иммунизация вакциной БЦЖ-М (RR 2,87). При этом вакцинация БЦЖ-М является прямым отражением отягощенного интранатального и раннего постнатального периодов.

Анализ функционального состояния органов и систем, а также наличие хронических заболеваний представлены в таблице 3.4.

Таблица 3.4 – Структура соматической патологии в группах сравнения

Структура болезней по МКБ-10	ТБ, n=110	ЛТИ, n=156	НТ, n=44	RR _{ТБ-ЛТИ} , 95%CI	Критерий $\chi^2_{ТБ-ЛТИ}$, p	RR _{ЛТИ-НТ} , 95%CI	Критерий $\chi^2_{ЛТИ-НТ}$, p
	abc(%)	abc(%)	abc(%)				
Некоторые инфекционные и паразитарные болезни (A00-B99), исключен туберкулез	20(18,2)	10(6,4)	0	2,836; 1,382- 5,820	8,934; 0,001	«неопределенный»	2,969; 0,042
Болезни крови, кроветворных органов и отдельные нарушения, вовлекающие иммунный механизм (D50-D89)	16(14,5)	17(10,9)	5(11,4)	1,335; 0,706- 2,525	0,790; 0,187	0,959; 0,375- 2,453	0,008; 0,465
Болезни эндокринной системы, расстройства питания и нарушения обмена веществ (E00-E90)	7(6,4)	5(3,2)	1(2,3)	1,985; 0,647- 6,093	1,494; 0,111	1,410; 0,169- 11,760	0,103; 0,374
Болезни нервной системы (G00-G99)	11(10)	19(12,2)	16(36,4)	0,821; 0,407- 1,656	0,306; 0,290	0,335; 0,189- 0,595	13,9; 0,0001
Болезни глаза и его придаточного аппарата (H00-H59)	15(13,6)	19(12,2)	2(4,5)	1,12; 0,596- 2,105	0,123; 0,363	2,679; 0,649- 11,060	2,128; 0,072
Болезни системы кровообращения (I00-I99)	7(6,4)	13(8,3)	0	0,764; 0,315- 1,852	0,360; 0,274	«неопределенный»	3,922; 0,024
Болезни органов дыхания (J00-J99), исключены случаи ОРВИ	16(14,5)	45(28,8)	4(9,1)	0,504; 0,301- 0,845	7,465; 0,003	3,173; 1,207- 8,339	7,241; 0,004
Болезни органов пищеварения (K00-K93)	34(30,9)	28(17,9)	3(6,8)	1,722; 1,133- 2,665	6,062; 0,007	2,632; 0,840- 8,253	3,246; 0,036

Продолжение таблицы 3.4

Болезни кожи и подкожной клетчатки (L00-L99)	7(6,4)	27(17,3)	4(9,1)	0,368; 0,166- 0,814	6,931; 0,004	1,904; 0,704- 5,151	1,769; 0,091
Болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани (M00-M99)	27(24,5)	32(20,5)	0	1,197; 0,763- 1,877	0,608; 0,218	«неопределенный»	10,74; 0,0005
Болезни мочеполовой системы (N00-N99)	8(7,3)	11(7,1)	1(2,3)	1,031; 0,429- 2,480	0,005; 0,473	3,103; 0,412- 23,380	1,39; 0,120
Врожденные аномалии [пороки развития], деформации и хромосомные нарушения (Q00-Q99), исключены МАРС	12(10,9)	45(28,8)	0	0,378; 0,210- 0,681 2,836; 0,725-11,1	12,33; 0,0002 2,461; 0,058	«неопределенный»	16,38; 0,00003

В структуре соматической патологии (табл. 3.4) можно выделить несколько групп болезней, участвующих в формировании риска развития ТБ: некоторые инфекционные и паразитарные болезни (RR 2,836), болезни крови, кроветворных органов и отдельные нарушения, вовлекающие иммунный механизм (RR 1,335), болезни эндокринной системы, расстройства питания и нарушения обмена веществ (RR 1,985), болезни глаза и его придаточного аппарата (RR 1,12), болезни органов пищеварения (RR 1,722), болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани (RR 1,197), болезни мочеполовой системы (RR 1,031), врожденные аномалии (пороки развития), деформации и хромосомные нарушения (без МАРС) (RR 2,836). При этом, рассматривая паразитарные инвазии, можно говорить о ситуации, косвенно отражающей уровень санитарной грамотности родителей и низкий социальный уровень семьи [123], так, среди детей с выявленной патологией большая часть была из социально-неблагополучных семей (n=19; 17, 89,5%). А такие группы, как болезни глаза и его придаточного аппарата, костно-мышечной системы и соединительной ткани, мочеполовой системы, с одинаковой частотой регистрировали среди больных ТБ и среди лиц с ЛТИ (p>0,05).

Перечисленная группа болезней участвовала и в формировании риска развития ЛТИ, при этом дополнительно выделили группу болезней органов

дыхания (за исключением ОРВИ) (RR 3,173). При анализе данной патологии было установлено, что поражение лор-органов (хронический тонзиллит, ГНМ, аденоиды) отмечали с одинаковой частотой как среди больных ТБ (16, 14,5%), так и среди пациентов с ЛТИ (26, 16,7%), $p=0,767$. При этом среди лиц с ЛТИ также регистрировали случаи бронхиальной астмы (13, 8,3%) и аллергического ринита (19, 12,2%), среди больных ТБ ни одного случая не было зарегистрировано. Тем не менее ряд исследований указывает на высокий риск развития туберкулеза при регистрации бронхолегочной патологии у детей [15; 96; 123]. По результатам нашего наблюдения, данная группа заболеваний не формировала риски по ТБ, но могла создавать условия для снижения местного иммунитета [23; 28; 35; 88], что могло способствовать инфицированию МБТ.

3.3. Особенности эпидемиологического анамнеза при развитии ЛТИ и ее прогрессировании у детей

Многими исследователями основными факторами риска развития ТБ рассматриваются эпидемиологические [40; 55; 59; 78; 91; 93; 105; 116; 123; 124], в частности, контакт по ТБ. Мы также оценили данные факторы (таблица 3.5).

Таблица 3.5 – Результаты эпидемиологического анамнеза в группах ТБ и ЛТИ

Данные эпидемиологического анамнеза	ТБ, n=110	ЛТИ, n=156	RR _{ТБ-ЛТИ} , 95%CI	Критерий χ^2 ТБ-ЛТИ, p
	abc(%)	abc(%)		
Контакт с больным туберкулезом	74(67,3)	19(12,2)	5,523; 3,554-8,585	86,11; <0,0000001
- контакт семейный	47(42,7)	8(5,1)	8,332; 4,101-16,930	55,6; <0,0000001
- контакт бытовой	27(24,5)	11(7,1)	3,481; 1,804-6,716	16,12; 0,00003
инфицирование МБТ до трех лет	44(40)	52(33,3)	1,200; 0,872-1,651	1,243; 0,133
пропуск «виража туберкулиновых проб»	50(45,5)	24(15,4)	2,955; 1,939-4,502	29,05; <0,0000001

Следуя данным таблицы 3.5, по результатам эпидемиологического анамнеза высокий риск регистрировался при наличии семейного контакта с больным ТБ

(RR 8,332). Также отметили риск при пропуске «виража туберкулиновых проб» (RR 2,955), что не нашло отражения в клинических рекомендациях по ЛТИ [124]. Ранее в исследованиях Крюковой А. М. (2008) также было указание, что пропуск «виража» регистрировался у каждого третьего ребенка, больного туберкулезом [55]. Учитывая высокий процент пропуска «виража» (45,5%), а также наличие контакта с больным, отсутствие наблюдения в специализированном учреждении (только 17 детей находилось под наблюдением, 23%; см. глава 2), можно говорить об отсутствии профилактических мероприятий для предупреждения ТБ, что и формировало высокий риск его развития.

В качестве фактора неспецифического риска ТБ в настоящее время выделяют ранний возраст детей (до трех лет) [124], что было подтверждено в нашем исследовании (RR 1,2).

3.4. Стратификация рисков туберкулезной инфекции у детей

Результаты анализа анамнестических данных позволили выделить ряд факторов риска развития как ТБ, так и ЛТИ. Оценивая вклад каждого фактора в риск развития туберкулезной инфекции у детей, было проведено их ранжирование (таблицы 3.6 и 3.7).

Таблица 3.6 – Ранжирование признаков по их значимости для риска развития ТБ у детей

Признак (фактор риска)	ОШ _{ТБ-ЛТИ}	Ранг
в семье злоупотребляют алкоголем или наркотиками	43,260	1
образование родителей среднее или средне-специальное	33,650	2
жилищно-бытовые условия: неудовлетворительные	23,250	3
наследственность по туберкулезу:отягощена	19,430	4
семья малообеспеченная	15,140	5
контакт с больным туберкулезом	14,820	6
контакт по туберкулезу семейный	13,800	7

Продолжение таблицы 3.6

вредные привычки матери вовремя беременности: курение, злоупотребление алкоголем, употребление наркотиков	8,948	8
семья многодетная	7,400	9
семья неполная	4,992	10
пропуск «виража туберкулиновых проб»	4583	11
контакт по туберкулезу бытовой	4,288	12
низкая результативность вакцинации БЦЖ(БЦЖ-М)	4,154	13
занятость отца: не работает	3,726	14
активность хронических инфекций у матери во время беременности	3,846	15
некоторые инфекционные и паразитарные болезни (A00-B99), исключен туберкулез	3,244	16
раннее начало кормления искусственным питанием	3,235	17
вакцинация: БЦЖ-М	3,104	18
врожденные аномалии [пороки развития], деформации и хромосомные нарушения (Q00-Q99), исключены МАРС	2,942	19
занятость матери: не работает	2,937	20
в семье курят	2,524	21
недоношенность	2,382	22
физическое и нервно-психическое развитие к 1 году жизни с задержкой	2,056	23
болезни эндокринной системы, расстройства питания и нарушения обмена веществ (E00-E90)	2,052	24
болезни органов пищеварения (K00-K93)	2,045	25
при рождении масса тела до 2500 г	1,815	26
ребенок не организован	1,723	27
патология в период родов (преждевременные, запоздалые, затяжные)	1,446	28
болезни крови, кроветворных органов и отдельные нарушения, вовлекающие иммунный механизм (D50-D89)	1,392	29
инфицирование МБТ до трех лет	1,333	30

Исходя из данных таблицы 3.6, было установлено 30 основных факторов риска развития ТБ, которые необходимо учитывать при сборе анамнеза у пациентов с ЛТИ. При этом ведущими для развития ТБ явились социальные факторы риска (в семье злоупотребление алкоголем и употребление наркотиков – ранг 1, в том числе курение в семье – ранг 21; среднее и средне-специальное образование родителей – ранг 2 и их безработица – ранг 14, 20; неудовлетворительные жилищно-бытовые условия – ранг 3 и низкое обеспечение семьи – ранг 5, а также многодетные – ранг 9 и неполные – ранг 10 семьи; неорганизованный ребенок – ранг 27) и отягощенная по туберкулезу наследственность – ранг 4. Учитывая низкий социальный уровень семьи (низкий

уровень санитарной грамотности [123]), возможна реализация и других факторов риска: контакта по ТБ – ранг 6, 7, 12 и неблагоприятного биологического анамнеза (антенатального – ранг 8, 15; интранатального – ранг 28 и постнатального – ранг 13, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 24, 25, 26, 29 периодов), а также ранее инфицирование МБТ – ранг 30 и пропуск «виража» – ранг 11.

Ранжирование факторов риска для ЛТИ позволил установить 20, в качестве основных (таблица 3.7).

Таблица 3.7 – Ранжирование признаков по их значимости для риска развития ЛТИ у детей

Признак (фактор риска)	ОШ _{ТБ-ЛТИ}	Ранг
детские инфекции (ветряная оспа)	4,737	1
патология при рождении: аномалии развития	4,574	2
врожденные аномалии [пороки развития], деформации и хромосомные нарушения (Q00-Q99)	4,357	3
профилактические прививки по индивидуальному графику	4,273	4
болезни органов дыхания (J00-J99), исключены случаи ОРВИ	4,054	5
наследственность по туберкулезу: отягощена	3,583	6
болезни мочеполовой системы (N00-N99)	3,262	7
болезни органов пищеварения (K00-K93)	2,990	8
болезни глаза и его придаточного аппарата (H00-H59)	2,912	9
болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани (M00-M99)	2,737	10
при рождении масса тела до 2500 г	2,633	11
возраст матери младше 18 лет и старше 25 лет	2,392	12
физическое и нервно-психическое развитие к 1 году жизни с задержкой	2,324	13
острые инфекции у матери во время беременности (ОРВИ)	2,059	14
отягощенный аллергологический анамнез	2,007	15
перенесенные ОРВИ до 1 года	1,759	16
занятость отца: не работает	1,718	17
оперативные роды: кесарево сечение	1,606	18
болезни эндокринной системы, расстройства питания и нарушения обмена веществ (E00-E90)	1,424	19
5 и более эпизодов ОРВИ в год (группа детей с рекуррентными заболеваниями)	1,212	20

Исходя из таблицы 3.7, среди основных рисков развития ЛТИ ведущими, в отличие от ТБ, выступали факторы, отражающие неблагоприятный биологический анамнез, обусловленный отягощенным антенатальным (ранг 6, 12, 14), интранатальным (ранг 18) и постнатальными периодами развития ребенка

(ранг 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 15, 16, 19, 20). Поэтому, с одной стороны, данные результаты можно было бы рассматривать как факторы, влияющие на системный и местный иммунитет, что способствовало реализации инфицирования МБТ. С другой стороны, инфицирование МБТ – неизбежный этап формирования иммунитета в условиях напряженной эпидемиологической ситуации по туберкулезу в регионе [77].

Резюме:

В настоящее время для развития ТБ у детей с ЛТИ сохранили значимость социальные факторы риска, при этом они являлись ведущими. Несмотря на это, в клинических рекомендациях по ЛТИ они представлены ограниченно и такие факторы, как многодетная, неполная, малообеспеченная семья, низкий уровень образования родителей, неблагоприятные жилищно-бытовые условия, курение в семье не рассматривались. Дополнительно среди социальных факторов впервые был установлен высокий риск по ТБ среди детей со статусом «неорганизованный». Среди эпидемиологических дополнительно были выявлены такие факторы риска, как пропуск «виража» и инфицирование МБТ до трех лет и сохранение в качестве фактора высокого риска контакт с больным ТБ. Среди медико-биологических впервые дополнительно установили риски для ТБ при наличии активности хронических инфекций у матери во время беременности, иммунизации вакциной БЦЖ-М (как отражение отягощенного биологического анамнеза), задержке физического и нервно-психического развития к первому году жизни, а также подтвердили значимость таких факторов (но не нашедших отражение в клинических рекомендациях ЛТИ), как наличие вредных привычек у матери во время беременности, низкая результативность вакцинации против ТБ, отсутствие грудного вскармливания, недоношенность и низкая масса тела при рождении (менее 2500 г), наличие патологии в периоде родов и сопутствующая соматическая патология. Рассматривая соматическую патологию в качестве риска ТБ, установили, что частые простудные заболевания (категория часто болеющего ребенка) его не формировали, так же как и хроническое заболевание органов дыхания – бронхиальная астма.

Учитывая, что ранее факторы риска развития ЛТИ не выделялись, мы впервые отметили необходимость разделения рисков для туберкулезной инфекции на разных этапах ее развития, так как вклад каждого из них не равнозначен. Как ранее нами было отмечено, для ТБ основными явились социальные факторы риска, для ЛТИ – медико-биологические.

ГЛАВА 4. КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЛАТЕНТНОЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ И ПРИ ЕЕ ПРОГРЕССИРОВАНИИ У ДЕТЕЙ

4.1. Результаты клинического обследования детей в период ЛТИ и при ее прогрессировании

Сравнительный анализ результатов клинического и лабораторного обследования детей в период ЛТИ и заболевания ТБ представлены в таблице 4.1.

Таблица 4.1 – Результаты клинко-лабораторного обследования детей с ЛТИ и больных ТБ

Признаки	ТБ, n=110	ЛТИ, n=156	Критерий $\chi^2_{\text{ТБ-ЛТИ}}$, p	ОШ
	abc(%)	abc(%)		
Инттоксикационный синдром	21(19,1)	14(9)	5,778; 0,008	2,393
Бронхолегочный синдром	10(9,1)	12(7,7)	0,166; 0,342	1,200
Параспецифические реакции	21(19,1)	36(23,1)	0,609; 0,218	0,787
Периферическая лимфаденопатия	18(16,4)	19(12,2)	0,943; 0,166	1,411
ГНМ I-II степени	26(23,6)	42(26,9)	0,366; 0,273	0,840
Аденоиды	2(1,8)	25(16)	14,28; 0,00008	0,097
Кариес	6(5,5)	14(9)	1,149; 0,143	0,585
Гепатомегалия	7(6,4)	4(2,6)	2,349; 0,063	2,583
Спленомегалия	10(9,1)	4(2,6)	5,512; 0,009	3,800
Очаги хронической инфекции	11(10)	29(18,6)	3,726; 0,027	0,487
Респираторный аллергоз	0	24(15,4)	18,6; 0,000008	0,0
ДМТ	24(21,8)	20(12,8)	3,783; 0,026	1,898
ИМТ	5(4,5)	16(10,3)	2,894; 0,044	0,417
Анемия	16(14,5)	13(8,3)	2,563; 0,054	1,872
ускорение СОЭ	25(22,7)	18(11,5)	5,959; 0,007	2,255

Продолжение таблицы 4.1

лейкоцитоз	16(14,5)	28(17,9)	0,541; 0,231	0,778
лимфоцитоз	43(39,1)	44(28,2)	3,473; 0,031	1,634
моноцитоз	19(17,3)	25(16)	0,073; 0,394	1,094
эозинофилия	40(36,4)	15(9,6)	28,14; <0,0000001	5,371

Как видно из таблицы 4.1, при осмотре 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, чаще выявляли очаги хронической инфекции (18,6%, $p=0,027$) и аллергические заболевания 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, также были значимыми 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%) она была связана с паразитарными инвазиями. Поэтому в целом изменения, регистрируемые при ТБ, характеризовали течение специфического воспалительного процесса [56; 57; 91], полученные результаты позволяли предположить и наличие иммунологических изменений при развитии ТБ у детей.

4.2. Результаты иммунологического обследования детей в период ЛТИ и при ее прогрессировании

Сравнительная оценка результатов иммунного статуса по исследованию крови детей с ЛТИ, больных ТБ и не инфицированных МБТ, представлена в

таблице 4.2. (чтобы результаты были сопоставимы, оценка проведена среди детей до 8 лет).

Таблица 4.2 – Показатели иммунологического анализа крови детей с ЛТИ, больных ТБ и не инфицированных МБТ, раннего и дошкольного возраста

Показатели	Референсные значения	ТБ		ЛТИ		НТ	
		n	M±SEM	n	M±SEM	n	M±SEM
CD3, %	54-82	15	65,8±1,3	16	66,2±1,3	10	69,1±1,7
CD3, абс	1,65	15	1,8±0,1	9	2,2±0,3	8	2,1±0,2
CD4, %	30-50	15	40,4±1,5	16	39,0±1,3	10	40,8±1,0
CD4, абс	0,92	15	1,1±0,1	9	1,2±0,15	8	1,2±0,1
CD8, %	18-38	15	29,4±1,4	16	26,9±1,2	10	28,9±1,4
CD8, абс	0,60	15	0,8±0,06	9	0,9±0,15	8	0,9±0,09
CD16, %	6-18	14	11,4±0,5**	20	13,4±0,6	10	17,1±2,7
CD16, абс	0,31	14	0,3±0,03**	15	0,4±0,04	10	0,6±0,1
CD20, %	6-22	15	16,2±1,5	12	16,8±1,75	3	14,0±1,2
CD20, абс	0,20	15	0,5±0,07	5	0,6±0,1	-	-
HLA DR, %	14-25	15	25,9±1,4**	20	23,7±1,6	9	21,8±1,1
HLA DR, абс	0,33	15	0,7±0,07	15	0,7±0,09	9	0,7±0,07
ИФН-γ спон., пг/мл	0,16-10	50	21,1±5,7**	110	20,5±3,0***	43	12,9±1,7
Иммуноглобулин G, г/л	8,12-16,14	19	11,7±0,6*,**	110	9,7±0,2	43	8,9±0,3
Иммуноглобулин A, г/л	0,75-3,17	19	1,6±0,1*,**	110	1,2±0,06	43	1,0±0,08
Иммуноглобулин M, г/л	0,69-3,00	19	1,4±0,2	110	1,15±0,05	43	1,2±0,08
Иммуноглобулин E, МЕ/мл	<150	19	306,6±130,7*	108	79,3±12,6	23	81,9±25,5
Фагоцитоз с латексом, %	52-95	15	68,5±3,1**	107	65,7±1,4	33	53,3±2,7
НСТ-тест: -спонтанный, %	6-12	16	14,4±1,9**	109	20,9±1,3	41	24,4±1,6
-стимулированный, %	-	16	37,8±3,2**	109	46,5±2,2	41	56,5±3,3

Примечание:

* $p \leq 0,05$ между результатами детей больных туберкулезом и пациентов с латентной туберкулезной инфекцией (критерий Манна-Уитни, U).

** $p \leq 0,05$ между результатами детей больных туберкулезом и пациентов не инфицированных МБТ (критерий Манна-Уитни, U).

*** $p \leq 0,05$ между результатами детей с латентной туберкулезной инфекцией и пациентов не инфицированных МБТ (критерий Манна-Уитни, U).

Из таблицы 4.2 следует, что достоверных различий иммунологических показателей среди детей с ЛТИ и не инфицированных МБТ не было установлено ($p > 0,05$), за исключением оценки уровня спонтанного ИФН-γ (пг/мл) ($p \leq 0,05$). Среди детей всех групп отметили незначительное от нормы повышение

абсолютных показателей, характеризующих клеточное звено иммунитета, что могло свидетельствовать о наличии активации за счет неспецифических процессов. При этом значимо различались показатели CD 16, HLA DR и ИФН- γ спон., которые были выше среди детей, больных туберкулезом, кроме показателя CD 16 (который значимо ниже, чем у детей, не инфицированных МБТ), что подтвердило развитие и течение воспалительного процесса (в данном случае специфического). Так как ИФН- γ представляет собой важнейший фактор, активирующий макрофаги, что способствует более эффективному уничтожению внутриклеточных микроорганизмов (в данном случае МБТ) [46], в наших исследованиях этим можно объяснить факт повышения уровня спонтанного ИФН- γ еще в периоде ЛТИ (в сравнении с уровнем показателя у не инфицированных МБТ детей, $p \leq 0,05$), при этом можно предположить, что антигенная нагрузка не создавала условия для гиперактивации клеточного ответа. При этом в период развития ТБ показатель спонтанного ИФН- γ оставался на уровне периода ЛТИ ($p > 0,05$).

Как видно из таблицы 4.2, среди детей, больных ТБ, отмечена активация гуморального звена иммунитета (функциональная активность В-клеток, значительное повышение уровня IgE $306,6 \pm 130,7$ МЕ/мл). В свою очередь, учитывая повышенный уровень ИФН- γ , можно было бы предположить отсутствие высокого показателя IgE, так как ИФН- γ , будучи продуктом Th1, ингибирует пролиферацию Th2, индуцированное ИЛ-4 переключение синтеза Ig на IgE, но способствует переключению на IgG2 [34; 51; 442]. Данный факт мог свидетельствовать о недостаточной продукции ИФН- γ в период развития ТБ и формирования хронического воспаления.

Оценивая фагоцитарную активность клеток, отметили значимое повышение показателя, характеризующего фагоцитоз (ФАЛ, $p \leq 0,05$), только между результатами детей, больных ТБ, и пациентов, не инфицированных МБТ, тем не менее показатель был в пределах референсных значений. При этом отметили снижение резервных возможностей нейтрофилов (НСТ-тест: снижение

спонтанного и стимулированного показателя, $p \leq 0,05$), что также могло свидетельствовать о недостаточной активации клеток при развитии заболевания.

Таким образом, оценивая иммунный статус детей в период ЛТИ, снижения показателей не выявили, при этом установили слабовыраженную активацию клеточного ответа. При развитии ТБ также изменений, указывающих на развитие иммунодефицита, не установили, хотя многими исследователями отмечено формирование ТБ на фоне вторичного иммунодефицита [18; 56; 91; 194; 460]. Изменения иммунологических показателей характеризовали особенности течения воспалительного процесса при ТБ у детей, в том числе его хронизацию, ключевой особенностью явилась недостаточная функциональная активность клеток, в частности, недостаточная выработка ИФН- γ .

Резюме:

В современных условиях воспалительный процесс при развитии ТБ у детей характеризовался типичными проявлениями: интоксикационным и бронхолегочным синдромами, периферической лимфаденопатией, гепатоспленомегалией, дефицитом массы тела, анемией, умеренным ускорением СОЭ, лимфоцитозом и эозинофилией. Иммунологические изменения характеризовали течение воспалительного процесса при ТБ, особенностью которого явилась недостаточная продукция ИФН- γ .

ГЛАВА 5. ЗНАЧЕНИЕ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА *IFNG* (Т-1488С) И ГЕНА *MCP1* (С-2508Т) ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ

В последние годы проведены исследования для поиска генов-кандидатов при ТБ, вызывающих нарушения на уровне врожденного и адаптивного иммунитета [72; 211; 249; 278; 430; 461]. По нашему мнению, перспективным для оценки риска развития туберкулеза могут быть полиморфные варианты гена *IFNG* (Т-1488С) и гена *MCP1* (С-2508Т), так как наличие данных мутаций сказывается на продукции регуляторного белка [72].

Учитывая сказанное, была предпринята попытка выявить ассоциацию полиморфизма Т-1488С гена *IFNG* и полиморфизма С-2508Т гена *MCP1* с риском развития туберкулеза, особенностями его течения, а также с прогрессированием заболевания.

5.1. Частота полиморфного варианта гена *IFNG* (Т-1488С) у детей, больных туберкулезом

Ранее полученные результаты свидетельствовали о важности CD4-опосредованного иммунитета и IFN- γ в базовой устойчивости к МБТ, но полностью не раскрыли механизмы развития ТБ [278]. В этом контексте важна идентификация генетических факторов риска ТБ (например, полиморфные варианты гена, кодирующего IFN- γ (*IFNG*) [249, 430], что позволит ближе подойти к расшифровке основ патогенеза данного инфекционного заболевания. Исследования последних лет при активном ТБ показали вклад различных генов: интерферон-индуцируемых, миелоидных и воспалительных [430].

Большое внимание уделяется роли полиморфизмов гена *IFNG* в развитии различных заболеваний, в основном, рассматривают полиморфизм +874А/Т гена *IFNG* [8; 92; 97; 369; 385].

Поэтому для наилучшего понимания вклада гена *IFNG* в механизм иммунологической защиты против МБТ, значимости в предрасположенности к развитию ТБ и его прогрессированию у детей требуется оценка его полиморфного варианта.

Анализ распределения частот аллелей и генотипов исследуемого полиморфного варианта гена *IFNG* (Т-1488С) был выполнен у 81 пациента, больных туберкулезом, которые вошли в основную группу. В группу контроля вошли дети, не имеющие заболевания ТБ, – 88 человек. Результаты представлены в таблице 5.1.

Таблица 5.1 – Распределение частот аллелей и генотипов при полиморфизме Т-1488С гена *IFNG* среди детей исследуемых групп (абс, %)

Регистрируемый показатель		Основная группа, n=81	Контрольная группа, n=88	ОШ (95% ДИ)	p
генотип	ТТ	23 (28,4)	33 (37,5)	0,6609 (0,3458-1,263)	0,107
	ТС	42 (51,9)	32 (36,4)	1,885 (1,019-3,487)	0,022
	СС	16 (19,7)	23 (26,1)	0,696 (0,337-1,436)	0,167
аллель	Т	88 (54,3)	98 (55,7)	0,947 (0,616-1,453)	0,401
	С	74 (45,7)	78 (44,3)		

В ходе молекулярно-генетического исследования получены данные о том, что наиболее часто встречался гетерозиготный генотип полиморфного варианта Т-1488С гена *IFNG* среди детей основной группы (51,9%, $p=0,022$), что согласуется с данными литературы [72]. Среди детей контрольной группы гомозиготный генотип ТТ встречался у 37,5%, что было чаще, чем у детей контрольной группы, но статистически незначимо. Частота редкого гомозиготного генотипа СС среди детей основной группы составила 19,7%, контрольной – 26,1%, что также не имело достоверных различий.

Полученные результаты свидетельствовали о необходимости изучения гетерозиготного генотипа полиморфного участка Т-1488С гена *IFNG* на

различных этапах развития инфекции и на этапе вакцинации БЦЖ или БЦЖ-М для оценки его связи с туберкулезной инфекцией у детей.

5.2. Значение полиморфного варианта гена *IFNG* (T-1488C) в предрасположенности к развитию туберкулеза у детей

В ходе анализа распределения генотипов полиморфного гена *IFNG* (T-1488C) среди детей основной и контрольной групп (таблица 5.1) была установлена ассоциация гетерозиготного генотипа с ТБ ОШ=1,885 (95% ДИ 1,019-3,487; $p=0,022$). Для оценки значимости гетерозиготного генотипа полиморфного варианта T-1488C гена *IFNG* при развитии ТБ был рассчитан показатель относительного риска у носителей данного генотипа, который установили на уровне 1,688 (95% ДИ 1,218 – 2,339; ОШ=4,667, 95% ДИ 1,236-17,62; $p=0,008$).

Среди детей основной группы были пациенты с разными клиническими формами заболевания, так, дети с первичными по генезу формами ТБ – ТВЛУ, ПТК, ДТЛ, ТП – составили подгруппу «ТБ1» (N=81; n=61, 75,3%); детей с вторичными формами ТБ – ОТЛ и ИТЛ – включили в подгруппу «ТБ2» (N=81; n=20, 24,7%). С целью уточнения связи гетерозиготного генотипа полиморфного варианта гена *IFNG* (T-1488C) с особенностями течения ТБ проанализирована частота распределения генотипов среди детей, больных ТБ, в подгруппах наблюдения (таблица 5.2).

Таблица 5.2 – Распределение частот генотипов полиморфизма T-1488C гена *IFNG* среди детей подгрупп «ТБ1» и «ТБ2» (абс, %)

Регистрируемый показатель	«ТБ1», n=61	«ТБ2», n=20	Критерий χ^2 , p	ОШ (95% ДИ)
	абс.(%)	абс.(%)		
ТТ	19 (31,1)	4 (20)	$\chi^2=0,92$; p=0,337	0,553 (0,163-1,876)
ТС	29 (47,5)	13 (65)	$\chi^2=1,84$; p=0,175	2,049 (0,719-5,84)
СС	13 (21,3)	3 (15)	$\chi^2=0,38$; p=0,538	0,652 (0,165-2,569)

Исходя из таблицы 5.2, достоверных различий при распределении частот генотипов в подгруппах не было установлено. Были получены данные о том, что наиболее частый гетерозиготный генотип полиморфного варианта гена *IFNG* (T-1488C) выявлен у 65% детей с вторичными формами ТБ и у 47,5% детей с первичными формами заболевания (p=0,175).

Дополнительно был рассчитан риск развития вторичных форм ТБ (позднего рецидива) среди детей с первичными формами заболевания, связанных с гетерозиготным генотипом полиморфизма T-1488C гена *IFNG*. Коэффициент риска составил 1,499 (95% ДИ 0,788-2,852; p=0,088).

Среди детей (n=21) с осложненным течением ТБ, распространенных воспалительных процессах, в фазе распада и обсеменения, а также с бактериовыделением (МБТ+) чаще, чем среди детей с неосложненным течением заболевания, регистрировали гетерозиготный генотип полиморфизма T-1488C гена *IFNG* – 52,4% (ОШ=1,029; 95% ДИ 0,381-2,783; p=0,478), что позволило рассматривать данный генотип как дополнительный маркер по риску прогрессирования и тяжелого течения заболевания. Вероятный риск прогрессирования заболевания у лиц с гетерозиготным генотипом установили на уровне 74,07% (95% ДИ от 63,54 до 82,43%).

Таким образом, нами впервые было установлено, что гетерозиготный генотип полиморфного варианта T-1488C гена *IFNG* ассоциирован с ТБ у детей, как первичного, так и вторичного по генезу заболевания, также была установлена

связь гетерозиготного генотипа с осложненным течением специфического процесса, что позволяет рассматривать данный генотип в качестве маркера высокого риска развития заболевания и возможного его прогрессирования.

5.3. Клиническое значение полиморфного варианта гена *IFNG* (T-1488C) у детей, больных туберкулезом

Было выполнено сравнение демографических характеристик (пол, возраст), проводилась оценка распространения специфического процесса, наличия бактериовыделения, общесоматического статуса пациентов, выраженности интоксикационного и бронхо-легочного синдромов, параспецифических реакций, определялось наличие раннего инфицирования МБТ у носителей различных генотипов полиморфного варианта гена *IFNG* (T-1488C) в группе детей, больных ТБ (таблица 5.3). Для оценки ассоциации между генотипами и риском развития заболевания было рассчитано отношение шансов (ОШ) с 95% доверительным интервалом (ДИ).

Таблица 5.3 – Ассоциация генотипов полиморфного варианта гена *IFNG* (T-1488C) с различными клиническими характеристиками туберкулеза у детей

Показатель	Полиморфизм T-1488C гена <i>IFNG</i>				p	ОШ	95%ДИ
	Генотип ТС, n=42		Генотип ТТ и СС, n=39				
	абс.	%	абс.	%			
Пол: мужской	27	64,3	24	61,5	0,399	1,125	0,456-2,774
Возраст: 0-6 лет	13	31	15	38,5	0,239	0,717	0,286-1,797
7-14 лет	16	38,1	16	41	0,394	0,885	0,363-2,157
15-18 лет	13	31	8	20,5	0,143	1,737	0,629-4,797
Первичные формы	29	69	32	82,1	0,088	0,488	0,171-1,391
Вторичные формы	13	31	7	17,9	0,088	2,049	0,719-5,84
Специфический процесс ОД	40	95,2	37	94,9	0,664	1,081	0,145-8,07
Рентгенологические изменения:							
Односторонний процесс	30	71,4	23	59	0,120	1,739	0,69-4,385
Правосторонний процесс	26	61,9	17	43,6	0,134	2,294	0,563-9,35
Левосторонний процесс	4	9,5	6	15,4	0,134	0,436	0,107-1,777
Поражение до 2 – х сегментов	22	52,4	17	43,6	0,214	1,424	0,593-3,418
Поражение более 2 – х сегментов	10	23,8	8	20,5	0,361	1,211	0,423-3,47
Деструкция легочной ткани	6	14,3	4	10,3	0,303	1,458	0,379-5,614
Диссеминация	7	16,7	4	10,3	0,200	1,75	0,47-6,516
Очаг	19	45,2	20	51,3	0,293	0,785	0,328-1,88

Продолжение таблицы 5.3

Округлый и ограниченный инфильтрат легочной ткани	13	31	8	20,5	0,143	1,737	0,629-4,797
Плевральные изменения (выпот)	2	4,8	1	2,6	0,331	1,9	0,165-21,82
Поражения внутригрудных лимфатических узлов	30	71,4	32	82,1	0,130	0,547	0,190-1,573
Кальцинаты (определяемые во внутригрудных лимфатических узлах и легочной ткани)	19	45,2	22	56,4	0,159	0,638	0,266-1,535
Бактериовыделение	6	14,3	4	10,3	0,303	1,458	0,379-5,614
Раннее инфицирование МБТ (до трех лет)	15	35,7	14	35,9	0,493	0,992	0,4-2,462
Клинические проявления специфического процесса:	14	33,3	12	30,8	0,403	1,125	0,442-2,865
Интоксикационный синдром	5	11,9	8	20,5	0,147	0,524	0,155-1,765
Бронхо-легочный синдром	3	7,1	3	7,7	0,464	0,923	0,175-4,87
Параспецифические реакции	8	19	4	10,3	0,133	2,059	0,567-7,476
Периферическая лимфаденопатия	7	16,7	3	7,7	0,122	2,4	0,574-10,03
Анемия	8	19	4	10,3	0,133	2,059	0,567-7,476
СОЭ выше 10 мм/ч	14	33,3	5	12,8	0,015	3,4	1,091-10,6
Нарушения физического развития – ДМТ	10	23,8	7	17,9	0,259	1,429	0,484-4,219
Симптомы гепато-спленомегалии	7/21	33,3	2/24	8,3	0,024	5,5	0,997-30,36
Отягощенная по туберкулезу наследственность	17	40,5	13	33,3	0,253	1,36	0,549-3,369

Исходя из таблицы 5.3, в ходе анализа ассоциации значимого для ТБ гетерозиготного генотипа полиморфного варианта T-1488C гена *IFNG* было установлено, что риск был выше среди лиц мужского пола (ОШ 1,125), реализующийся в подростковом возрасте (ОШ 1,737) при развитии вторичных форм ТБ (ОШ 2,049) и преимущественном поражении органов дыхания (ОШ 1,081). Установлена связь данного генотипа со следующими рентгенологическими изменения со стороны органов дыхания: с односторонним поражением (ОШ 1,739), преимущественно правостороннем (ОШ 2,294), при объеме поражения 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 (признаками обсеменения легочной ткани) (ОШ 1,75), также определена ассоциация с рентгенологическими признаками плеврального выпота (ОШ 1,9). Установлена ассоциация гетерозиготного

генотипа полиморфного варианта T-1488C гена *IFNG* с высоким риском бактериовыделения МБТ (ОШ 1,458). Среди клинических проявлений ТБ (ОШ 1,125) у детей с гетерозиготным генотипом определена связь с параспецифическими реакциями (ОШ 2,059), с преимущественным проявлением в виде периферической лимфаденопатии (ОШ 2,4), с дефицитом массы тела (ОШ 1,429), с анемией (ОШ 2,059) и повышением уровня СОЭ (ОШ 3,4). При ультразвуковом исследовании органов брюшной полости дополнительно установили связь гетерозиготного генотипа исследуемого полиморфизма с признаками гепатоспленомегалии (ОШ 5,5). Дополнительно установлена ассоциация гетерозиготного генотипа с отягощенной по ТБ наследственностью (ОШ 1,36).

Для уточнения связи гетерозиготного генотипа полиморфного варианта T-1488C гена *IFNG* с факторами риска развития ТБ был проведен кластерный анализ (рисунок 5.1).

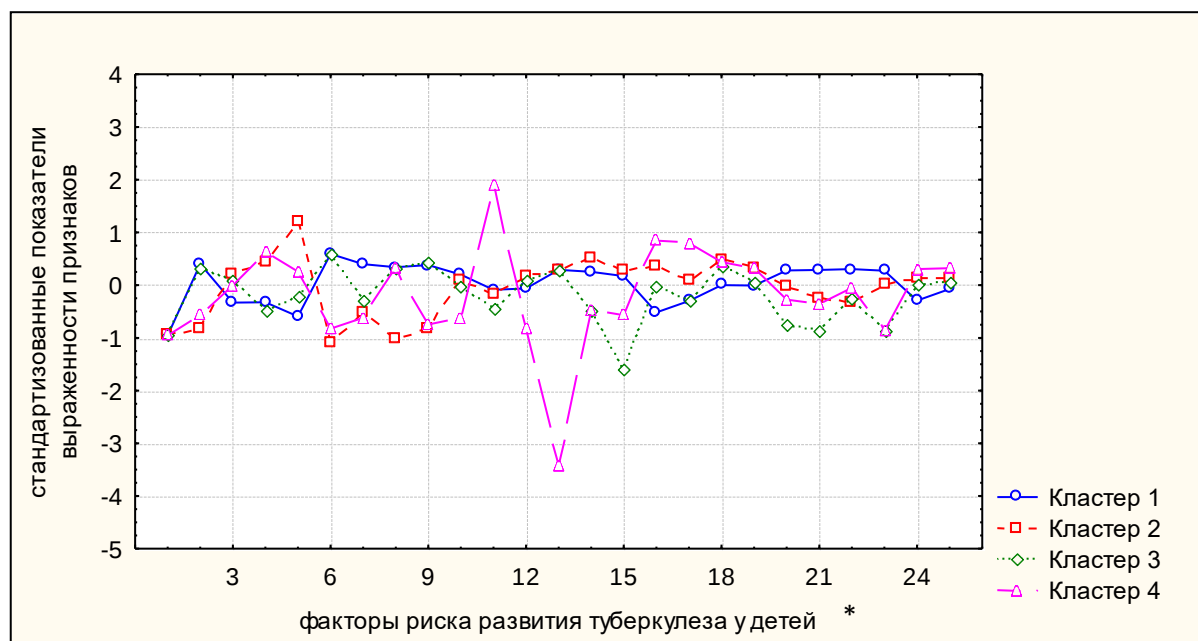


Рисунок 5.1 – Кластерный анализ стандартизованных показателей факторов риска развития туберкулеза у детей с гетерозиготным генотипом полиморфного варианта T-1488C гена *IFNG*

Примечание: *факторы риска развития туберкулеза у детей:

- 1 - генотип *IFNG* T(-1488)C (1-TC)
- 2 - ТБ1-1, ТБ2-2, РППТИ-3, Т-4

- 3 - пол женский-1, мужской-2
- 4 - результативна вакцинация БЦЖ-1, нет-2
- 5 - жилищно-бытовые условия удовлетворительные -1, нет-2
- 6 - малообеспеченная семья -1, нет -2
- 7 - в семье курят-1, нет-2
- 8 - в семье злоупотребляют алкоголем, наркотиками-1, нет-2
- 9 - наследственность по ТБ отягощена -1, нет-2
- 10 - осложненная беременность -1, нет-2
- 11 - роды срочные -1, нет-2
- 12 - роды оперативные -1, нет-2
- 13 - при рождении масса тела до 2500 г -1, более-2
- 14 - ОРВИ до 1 года -1, нет-2
- 15 - дефицитные состояния до 1 года -1, нет-2
- 16 - грудное вскармливание -1, нет-2
- 17 - перенесенные детские инфекции -1, нет-2
- 18 - отягощенный аллергологический анамнез-1, нет-2
- 19 - аллергические заболевания верхних и нижних дыхательных путей -1, нет-2
- 20 - относится к группе ЧБД -1, нет-2
- 21 - анемия -1, нет-2
- 22 - функциональные нарушения ЖКТ -1, нет-2
- 23 - ДМТ-1, нет-2
- 24 - ИМТ-1, нет-2
- 25 - регистрация хронических заболеваний -1, нет-2

При кластеризации был выделен вариант (кластер 2 и 4), связанный с гетерозиготным генотипом, ТБ и такими факторами риска ТБ, как малообеспеченная семья ($F\ 31,994$; $p=0,000000$), курение в семье ($F\ 5,193$; $p=0,003$), отягощенная наследственность по ТБ ($F\ 11,076$; $p=0,000006$), отсутствие грудного вскармливания ($F\ 6,965$; $p=0,0004$). Учитывая факторы риска ТБ и их связь с гетерозиготным генотипом изучаемого гена, рассчитали дополнительный риск развития заболевания, так, при курении в семье или пассивном курении он составил ОШ 1,927 (95% ДИ 1,004 – 3,699; $p=0,024$), при низком достатке в семье – ОШ 69,97 (95% ДИ 9,179 – 522,7; $p<0,0000001$) и при раннем переводе ребенка на искусственное вскармливание – ОШ 3,847 (95% ДИ 1,857 – 7,91; $p=0,000098$).

Таким образом, гетерозиготный генотип полиморфного варианта T-1488C гена *IFNG* подтверждал высокий риск развития ТБ и его прогрессирования.

5.4. Значение полиморфного варианта гена *IFNG* (T-1488C) среди детей с латентной туберкулезной инфекцией

Среди детей контрольной группы было выделено две группы: с ЛТИ («ЛТИ») – 72 пациента и не инфицированные МБТ («НТ») – 16 пациентов. С целью оценки значимости изучаемого полиморфного варианта определили частоту распределение генотипов полиморфизма T-1488C гена *IFNG* у детей группы «НТ», при этом установили достоверные различия как по гетерозиготному генотипу (3, 18,8%; $\chi^2=5,887$; $p=0,008$), так и по гомозиготному по аллелю T полиморфного участка T-1488C гена *IFNG* (9, 56,3%; $\chi^2=4,689$; $p=0,015$). Полученные результаты подтвердили, что замена цитозина на тимин (генотип TC) полиморфизма T-1488C гена *IFNG* связана с риском развития заболевания, а выявление у детей генотипа TT рассматривали как протективный иммуногенетический фактор в отношении ТБ. Полученные нами данные различались с результатами исследования Д. С. Ожеговой (2009), где среди взрослых доноров протективную роль в развитии иммунитета против *M. tuberculosis* играл аллель C T-1488C гена *IFNG* [72].

При оценке связи генотипов полиморфного гена *IFNG* (T-1488C) с восприимчивостью к МБТ не было получено значимых различий в распределении частот генотипов изучаемого полиморфного варианта гена среди детей с ЛТИ и НТ (таблица 5.4), что свидетельствовало о возможности инфицирования МБТ детей независимо от генотипа полиморфного участка T-1488C гена *IFNG*.

Таблица 5.4 – Распределение частот генотипов полиморфного варианта гена *IFNG* (T-1488C) среди детей с латентной туберкулезной инфекцией и не инфицированных МБТ (абс, %)*

Регистрируемый показатель	группа «ЛТИ», n=72	группа «НТ», n=16	Критерий χ^2 , p
	абс.(%)	абс.(%)	
ТТ	24 (33,3)	9 (56,2)	$\chi^2=3,511$; $p=0,173$
ТС	29 (40,3)	3 (18,8)	
СС	19 (26,4)	4 (25)	

Примечание: *таблица отвечает критериям Кохрена

Считается, что среди детей с ЛТИ в течение первого года инфицирования МБТ 5% пациентов формируют ТБ [180; 363; 440], поэтому нами был определен риск развития заболевания с учетом распределения генотипов полиморфного гена *IFNG* (T-1488C) среди детей в РППТИ (среди детей «ЛТИ» дополнительно выделили группу детей в раннем периоде первичной туберкулезной инфекции – «РППТИ», n=32) (таблица 5.5).

Таблица 5.5 – Распределение генотипов полиморфного варианта гена *IFNG* (T-1488C) среди детей в раннем периоде первичной туберкулезной инфекции и не инфицированных МБТ (абс, %)*

Регистрируемый показатель	Группа «РППТИ», n=32	Группа «НТ», n=16	Критерий χ^2 , p
	абс.(%)	абс.(%)	
ТТ	11 (34,4)	9 (56,2)	$\chi^2=2,756$; p=0,252
ТС	13 (40,6)	3 (18,8)	
СС	8 (25)	4 (25)	

Примечание: *таблица отвечает критериям Кохрена

Исходя из таблицы 5.5, при сравнении распределения генотипов в группе «РППТИ» и в группе «НТ» также не было установлено достоверных различий. Учитывая, что гетерозиготный генотип выступал в качестве фактора риска ТБ, была рассчитана вероятность развития заболевания у детей в РППТИ, она составила 51,33% (ОШ 1,574; 95% ДИ 0,687 – 3,607).

Для уточнения возможного риска развития ТБ также провели исследование среди детей, которые были инфицированы МБТ более 1 года (среди детей группы «ЛТИ» дополнительно выделили группу ранее инфицированных МБТ – «Т», n=40). Среди детей группы «Т» также вероятность развития заболевания была установлена у каждого второго ребенка (56,2%; 95% ДИ от 47,3 до 64,71%).

Таким образом, установили, что риск инфицирования МБТ среди детей не зависел от генотипа полиморфного варианта гена *IFNG* (T-1488C), тем не менее полученные результаты свидетельствовали о необходимости выделения группы высокого риска по ТБ среди лиц с ЛТИ носителей гетерозиготного генотипа

полиморфного варианта гена *IFNG* для предотвращения реализации риска по ТБ (организации профилактических мероприятий).

5.5. Полиморфный вариант гена *IFNG* (Т-1488С) и результативность вакцинации БЦЖ или БЦЖ-М среди детей с ЛТИ

Для оценки значимости полиморфизма гена *IFNG* в формировании адаптивного иммунитета к туберкулезной инфекции оценили результативность вакцинации БЦЖ или БЦЖ-М и ее ассоциацию с генотипами изучаемого гена. С этой целью определили частоту встречаемости генотипов полиморфизма Т-1488С гена *IFNG* у детей, вакцинированных БЦЖ или БЦЖ-М, среди лиц в РППТИ (таблица 5.6).

Таблица 5.6 – Распределение частот генотипов полиморфного варианта гена *IFNG* (Т-1488С) среди детей в раннем периоде первичной туберкулезной инфекции, в зависимости от результативности вакцинации БЦЖ или БЦЖ-М, (абс, %)

Регистрируемый показатель	Результативность вакцинации БЦЖ(М)		ОШ (95%ДИ)
	эффективная, n=20	мало-неэффективная, n=12	
	абс.(%)	абс.(%)	
ТТ	8 (40)	3 (25)	2 (0,411-9,743)
ТС	7 (35)	6 (50)	1,857 (0,432-7,977)
СС	5 (25)	3 (25)	1 (0,192-5,221)

По результатам распределения генотипов полиморфного гена *IFNG* (Т-1488С), в зависимости от результативности вакцинации против ТБ у детей в РППТИ установлено, что наиболее значимым для формирования низкой результативности вакцинации (мало- или неэффективной) являлся наиболее часто встречаемый (50%) гетерозиготный генотип полиморфного гена *IFNG* (Т-1488С), вероятность формирования низкой результативности вакцинации составила 59,38% (95% ДИ от 42,23 до 74,62%). Среди лиц с высокой результативностью вакцинации против ТБ чаще регистрировали гомозиготный генотип по аллелю Т (40%). Для уточнения связи результативности вакцинации БЦЖ или БЦЖ-М и

генетических показателей риска провели кластерный анализ, было сформировано 3 кластера (рисунок 5.2).

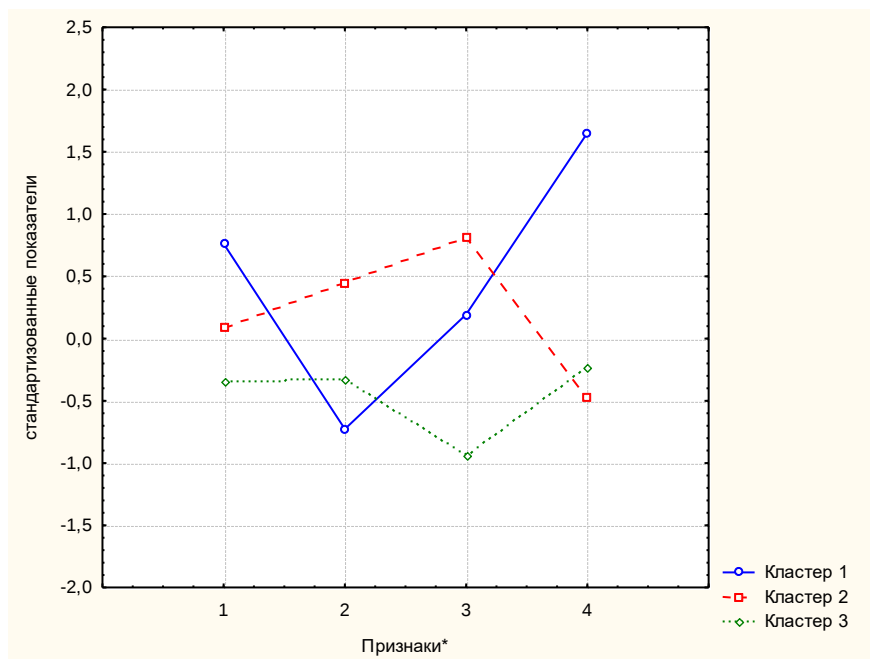


Рисунок 5.2 – Кластерный анализ результативности вакцинации БЦЖ или БЦЖ-М в зависимости от генотипов полиморфного варианта гена *IFNG* (T-1488C) у детей в раннем периоде первичной туберкулезной инфекции

Примечание: *1 - результативность вакцинации БЦЖ(М) (0 – мало- или неэффективная, 1 - эффективная); 2 - возраст детей 2-11 лет; 3 - *IFNG*_T(-1488)C (1-TC, 2-TT, 3-CC); 4 - ИФН- γ с CFP32B, пг/мл

Первый кластер характеризовался высокой результативностью вакцинации БЦЖ (БЦЖ-М) и был ассоциирован с гомозиготным генотипом по аллелю Т полиморфного гена *IFNG* (T-1488C), высоким уровнем продукции ИФН- γ с CFP32B, что подтверждало протективное действие данного генотипа. Второй и третий кластеры характеризовались низкой результативностью вакцинации БЦЖ (БЦЖ-М), которая была связана со снижением продукции ИФН- γ и генотипами TC и CC полиморфного варианта гена *IFNG* (T-1488C). Дисперсионный анализ показал, что все признаки вносили значимый вклад в оценку формирования поствакцинального иммунитета: TT генотип *IFNG* (T-1488C) ($F=24,368$; $p=0,000001$), высокий уровень продукции ИФН- γ с CFP32B ($F=21,128$; $p=0,000004$), ранний возраст ($F=3,87$; $p=0,034$).

Таким образом, по нашим данным было подтверждено, что гомозиготный генотип по аллелю Т связан с протективным противотуберкулезным иммунитетом, а гетерозиготный генотип полиморфного варианта гена *IFNG* (Т-1488С) можно рассматривать в качестве дополнительного фактора риска низкой результативности вакцинации БЦЖ или БЦЖ-М.

5.6. Значение полиморфного варианта гена *MCP1* (С-2508Т) в предрасположенности к прогрессированию специфического процесса у детей

Среди генов регуляторных молекул, которые обеспечивают начальные этапы развития иммунного ответа, в том числе и при туберкулезной инфекции, помимо гена *IFNG* выделяли ген моноцитарного хемотаксического протеина – *MCP1*. Учитывая роль хемотаксического для макрофагов белка 1 (*MCP1*) в развитии воспаления, в том числе при формировании хронического (гранулематозного) воспаления [211] и иммунного ответа, опосредованного Th2 типа [133; 296; 327; 339; 395; 398], он может принимать участие и в прогрессировании туберкулезного процесса. При этом были попытки оценить роль гена *MCP1* в восприимчивости к ТБ [72; 461], но рекомендаций, позволяющих дифференцированно оценивать вклад данного гена в развитие заболевания, на сегодняшний день нет.

Поэтому для наилучшего понимания вклада гена *MCP1* в механизм иммунологической защиты против МБТ, значимости в предрасположенности к развитию ТБ и его прогрессированию у детей также требуется оценка его полиморфного варианта.

Анализ распределения частот аллелей и генотипов исследуемого полиморфного варианта гена *MCP1* (С-2508Т) был выполнен у 81 пациента основной группы и у 88 – группы контроля, результаты представлены в таблице 5.7.

Таблица 5.7 – Распределение частот генотипов и аллелей полиморфизма С-2508Т гена *MCP1* среди детей исследуемых групп (абс, %)

Регистрируемый показатель	Основная группа, n=81, абс.(%)	Контрольная группа, n=88, абс.(%)	Критерий χ^2 , p	ОШ (95% ДИ)
ТТ	36 (44,4)	50 (56,8)	$\chi^2=2,584$; p=0,054	0,608 (0,331-1,117)
ТС	38 (47)	32 (36,4)	$\chi^2=1,935$; p=0,082	1,547 (0,836-2,862)
СС	7 (8,6)	6 (6,8)	$\chi^2=0,198$; p=0,328	1,293 (0,416-4,021)
С	52 (32,1)	44 (25)	$\chi^2=2,09$; p=0,074	1,418 (0,882-2,279)
Т	110 (67,9)	132 (75)		

В результате анализа распределения частот аллельных вариантов гена *MCP1* установили доминирование генотипа ТС полиморфного участка С-2508Т гена *MCP1* среди детей основной группы (47%), при этом полученные результаты достоверно не различались с контрольной группой. Среди детей контрольной группы наиболее частый гомозиготный генотип ТТ составил 56,8%, также без достоверных различий. Частота редкого гомозиготного генотипа СС составила среди детей основной группы 8,6%, контрольной – 6,8% (p=0,328).

Полученные результаты свидетельствовали о необходимости изучения гетерозиготного генотипа полиморфного участка С-2508Т гена *MCP1* для оценки его связи с туберкулезной инфекцией у детей. С этой целью рассмотрели распределение генотипов в зависимости от клинической формы заболевания и его течения (таблица 5.8).

Таблица 5.8 – Распределение частот генотипов полиморфизма С-2508Т гена *MCP1* среди детей подгрупп «ТБ1» и «ТБ2» (абс, %)

Регистрируемый показатель	«ТБ1», n=61	«ТБ2», n=20	Критерий χ^2 , p	ОШ (95% ДИ)
	абс.(%)	абс.(%)		
ТТ	29 (47,5)	7 (35)	$\chi^2=0,959$; p=0,164	1,683 (0,591-4,796)
ТС	29 (47,5)	9 (45)	$\chi^2=0,039$; p=0,422	1,108 (0,402-3,054)
СС	3 (5)	4 (20)	$\chi^2=4,339$; p=0,019	0,207 (0,042-1,021)

Исходя из таблицы 5.8, среди пациентов подгруппы «ТБ1» (N=81; n=61, 75,3%) распределение по генотипам (ТТ и ТС) полиморфного варианта гена *MCP1* (C-2508T) достоверно не отличалось от результатов подгруппы «ТБ2» (N=81; n=20, 24,7%). При этом у пациентов подгруппы «ТБ1» с одинаковой частотой регистрировали гетерозиготный генотип и гомозиготный по аллелю Т – 47,5%. Среди детей подгруппы «ТБ2» чаще, чем другие генотипы, регистрировали гетерозиготный генотип ТС полиморфного участка C-2508T гена *MCP1* – 45%, при этом статистически незначимо ($\chi^2=2,85$; $p=0,241$).

Среди детей с осложненным течением заболевания, распространенными процессами и с бактериовыделением (МБТ+) чаще регистрировали гетерозиготный генотип (ОШ_{ТС-ТТ}=1,761; 95% ДИ 0,608-5,096 и ОШ_{ТС-СС}=3,662; 95% ДИ 0,969-13,84), это позволило рассматривать данный генотип как дополнительный критерий риска прогрессирования и тяжелого течения заболевания. Была рассчитана вероятность прогрессирования ТБ, которая составила 76,54% (95% ДИ от 66,17 до 84,51%) у детей с носительством гетерозиготного генотипа.

При оценке связи генотипа полиморфного варианта гена *MCP1* (C-2508T) с восприимчивостью к МБТ не было получено значимых различий в частоте встречаемости генотипов среди детей с ЛТИ и НТ (таблица 5.9), при этом и в группе «ЛТИ» и «НТ» чаще регистрировали гомозиготный генотип по аллелю Т (51,4% и 81,2% соответственно).

Таблица 5.9 – Распределение частот генотипов полиморфного варианта гена *MCP1* (C-2508T) среди детей с латентной туберкулезной инфекцией и не инфицированных МБТ (абс, %)*

Регистрируемый показатель	группа «ЛТИ», n=72	группа «НТ», n=16	Критерий χ^2 , p
	абс.(%)	абс.(%)	
ТТ	37(51,4)	13(81,2)	$\chi^2=5,056$; $p=0,080$
ТС	29 (40,3)	3(18,8)	
СС	6(8,3)	0	

Примечание: *таблица отвечает критериям Кохрена

Таким образом, впервые установлено, что при развитии ТБ можно выделить дополнительный генетический показатель риска его прогрессирования и тяжелого течения – гетерозиготный генотип при полиморфизме С-2508Т гена *MCP1*.

5.7. Значение полиморфного варианта гена *IFNG* (Т-1488С) для уровня ИФН-γ у детей исследуемых групп

Для проверки связи полиморфизма гена *IFNG* (Т-1488С) с уровнем продукции его цитокина нами проведена оценка спонтанного уровня ИФН-γ независимо от стадии туберкулезной инфекции. Нами было установлено, что уровень спонтанной продукции ИФН-γ не зависел от генотипа полиморфного гена *IFNG* (Т-1488С) ($H=0,039$; $p=0,983$). В связи с этим для уточнения связи генотипа полиморфного варианта гена *IFNG* (Т-1488С) с уровнем продукции ИФН-γ при прогрессировании туберкулезной инфекции и формировании заболевания определили уровень данного цитокина у детей с ЛТИ и с ТБ при различных генотипах (таблица 5.10).

Таблица 5.10 – Уровень продукции спонтанного ИФН-γ (пг/мл) в зависимости от генотипов полиморфного варианта Т-1488С гена *IFNG* у детей исследуемых групп, МЕ ($Q_{25\%}$: $Q_{75\%}$)

Группы	генотип			Критерий Краскела-Уоллиса (H), p
	ТТ	ТС	СС	
«ТБ», N=81	n=23	n=42	n=16	H = 4,810; p=0,090
	18,9 (10,8:14,1)	33,2 (9,7:13,2)	11,6 (10,5:13,2)	
«ЛТИ», N=72	n=24	n=29	n=19	H = 1,663; p=0,435
	25,5 (9:16,1)	33,1 (11,5:15)	19,1 (10,5:13,2)	

Как видно из таблицы 5.10, при анализе показателей спонтанного ИФН-γ (пг/мл) не было установлено значимых различий уровня продукции цитокина в зависимости от генотипа полиморфного варианта Т-1488С гена *IFNG* как среди детей с ЛТИ, так и при развитии ТБ.

Таким образом, по результатам наших исследований уровень продукции спонтанного ИФН- γ не зависел от генотипа при полиморфизме гена *IFNG* (T-1488C), в том числе при развитии ТБ у детей.

Известно, что до развития заболевания длительное время туберкулезная инфекция протекает бессимптомно и ее можно выявить только с помощью иммунологического анализа [279; 430]. При этом, учитывая генетические факторы и связанный с ними риск развития туберкулезной инфекции, не исключена их роль в формировании определенных фенотипов количественной оценки иммунного ответа на туберкулезную инфекцию [230; 248; 249; 268; 455]. Поэтому, учитывая отсутствие связи с генотипами при спонтанном ответе, в настоящее время представляет интерес изучение их обусловленности с интенсивностью ответа при стимуляции МБТ антигенами. С целью выявления влияния генотипов полиморфного варианта T-1488C гена *IFNG* на уровень продукции ИФН- γ после стимуляции специфическими антигенами (CFP32B, Rv2660c, ESAT6, Ag85a, ESAT6-CFP10) и туберкулиновую реактивность при развитии заболевания провели оценку показателей (уровня индуцированного ИФН- γ) у детей при развитии ТБ в зависимости от генотипов (таблица 5.11).

Таблица 5.11 – Уровень продукции индуцированного ИФН- γ (пг/мл) специфическими антигенами в зависимости от генотипов полиморфного варианта T-1488C гена *IFNG* при туберкулезе, ME ($Q_{25\%}$: $Q_{75\%}$)

Специфические антигены	группа «ТБ», N=81		Критерий Манна- Уитни (U), p
	генотип		
	TC, n=42	TT и CC, n=39	
ППД-Л	1001,6 (698:1200)	1380,7 (741,5:1294,5)	U=703,5; p=0,275
CFP32B	69,8 (10,2:68)	95,8 (21:122,5)	U=554,5; p=0,018
Rv2660c	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 5.11, показал, что при развитии туберкулеза определена связь между генотипом полиморфного варианта гена *IFNG* (T-1488C) и уровнем индуцированного ИФН- γ . При туберкулезе уровень индуцированного ИФН- γ (при индукции специфическими антигенами CFP32B, Rv2660c, ESAT6, 85a) значительно снижался при гетерозиготном генотипе полиморфного варианта T-1488C гена *IFNG*. Учитывая полученные результаты для уточнения связи гетерозиготного генотипа исследуемого полиморфизма с выраженностью иммунного ответа, проанализировали частоту встречаемости отрицательного результата в тестах при стимуляции специфическими антигенами у детей, больных ТБ (таблица 5.12).

Таблица 5.12 – Связь генотипов полиморфного варианта гена *IFNG* (T-1488C) с выраженностью иммунного ответа на специфические антигены у детей, больных туберкулезом

Определение индуцированного уровня ИФН- γ , отрицательный результат по и.с.	Полиморфизм T-1488C гена <i>IFNG</i>				p	ОШ	95%ДИ
	Генотип TC, n=42		Генотип TT и CC, n=39				
	абс.	%	абс.	%			
ППД-Л	3	7,1	1	2,6	0,202	2,923	0,291-29,35
ESAT6-CFP10	8	19	3	7,7	0,068	2,824	0,691-11,53
ESAT6	40	95,2	24	61,5	0,0001	12,5	2,628-59,47
Rv2660c	37	88,1	30	76,9	0,092	2,22	0,672-7,33
CFP32B	34	81	19	48,7	0,0012	4,474	1,656-12,08
85a	34	81	19	48,7	0,0012	4,474	1,656-12,08

Анализ таблицы 5.12 показал наличие ассоциации гетерозиготного генотипа полиморфного варианта гена *IFNG* (T-1488C) со снижением иммунного ответа при индукции специфическими антигенами.

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) (рисунок 5.3).

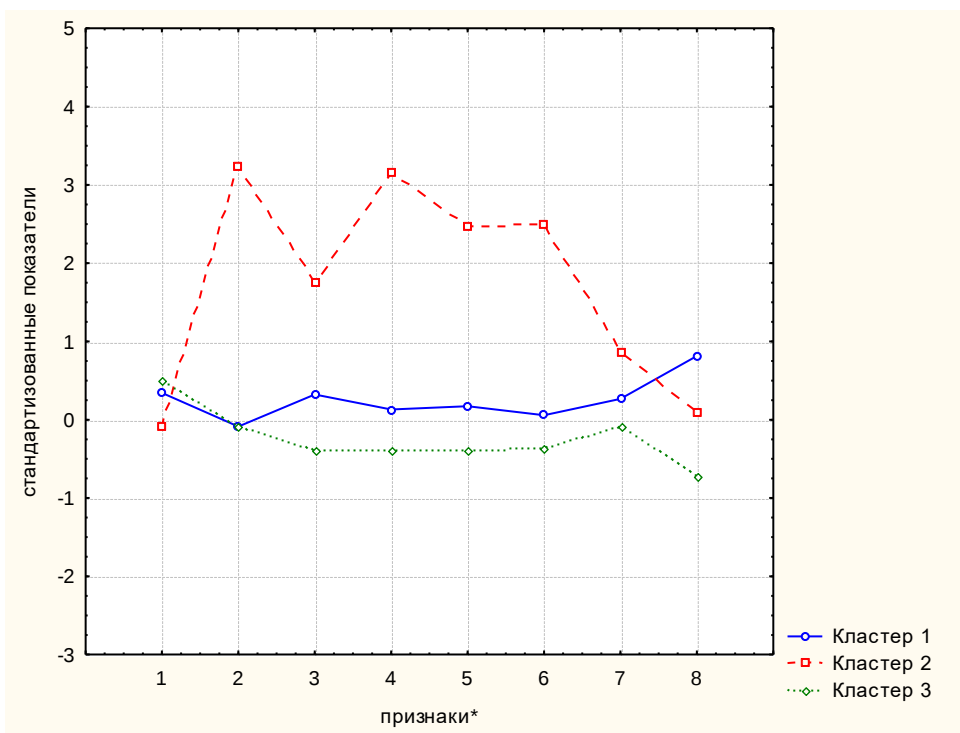


Рисунок 5.3 – Кластерный анализ по стандартизованным показателям уровня ИФН- γ индуцированного специфическими антигенами (и.с.) в зависимости от генотипов полиморфного варианта гена *IFNG* (T-1488C) у детей групп «ТБ» и «ЛТИ»

Примечание: *1- группы (ТБ-3; ЛТИ-2); 2 - ИФН- γ с ППД-Л, и.с.; 3 - ИФН- γ с CFP32В, и.с.; 4 - ИФН- γ с Rv2660с, и.с.; 5 - ИФН- γ с ESAT6, и.с.; 6 - ИФН- γ с Ag85a, и.с.; 7 - ИФН- γ с ESAT6-CFP10, и.с.; 8 - INFG_T(-1488)C (1-TC, 2-TT, 3-CC)

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, 85a) 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 говорить об ассоциации 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 подтверждало протективную роль генотипа ТТ при полиморфизме гена *IFNG* (Т-1488С), а выраженные реакции на специфические антигены свидетельствовали о формировании адекватного противотуберкулезного иммунитета.

Дисперсионный анализ показал значимый вклад следующих признаков при развитии туберкулезной инфекции: генотипов полиморфного гена *IFNG* (Т-1488С) ($F=77,874$; $p=0,000000$), туберкулина ($F=73,445$; $p=0,000000$) и белков ранней стадии туберкулезной инфекции – Rv2660с ($F=102,137$; $p=0,000000$), 85a ($F=69,722$; $p=0,000000$), ESAT6 ($F=46,857$; $p=0,000000$), CFP32В ($F=24,065$; $p=0,000000$); менее значимым был гибридный белок ESAT6-CFP10 ($F=3,676$; $p=0,028$).

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.

Резюме:

Оценивая функциональную значимость полиморфных вариантов генов *IFNG* (Т-1488С) и *MCP1* (С-2508Т) в механизмах иммунологической защиты против микобактерий и определении предрасположенности к ТБ у детей, впервые установили, что маркером высокого риска развития ТБ как при первичном, так и вторичном по генезу варианту заболевания и его неблагоприятного течения являлся гетерозиготный генотип полиморфного варианта Т-1488С гена *IFNG*. В то же время в качестве дополнительного генетического фактора риска прогрессирования и тяжелого течения заболевания установлен гетерозиготный генотип при полиморфизме С-2508Т гена *MCP1*. Косвенным показателем, свидетельствующим о гетерозиготном генотипе полиморфного варианта Т-1488С гена *IFNG*, может быть низкая результативность вакцинации БЦЖ (БЦЖ-М).

Впервые была определена ассоциация полиморфизма гена *IFNG* (T-1488C) с различной выраженностью иммунного ответа против отдельных МБТ антигенов. Впервые установили связь при развитии ТБ гетерозиготного генотипа полиморфного варианта гена с низким уровнем индуцированного цитокина. Также была определена протективная роль гомозиготного генотипа по аллелю Т при полиморфизме гена *IFNG* (T-1488C) и его связь с формированием адекватного противотуберкулезного иммунитета у детей.

ГЛАВА 6. ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ БЕЛКОВ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ

Приоритетной задачей исследований последнего времени является комплексное изучение специфических иммунологических маркеров для понимания всех этапов развития туберкулезной инфекции [254].

Однако идентификация таких потенциальных маркеров – специфических антигенов – представляет собой непростую задачу, поскольку их количественный и качественный составы могут существенно меняться от инфицирования до заболевания [311]. Поэтому распознавание клетками хозяина антигенов МБТ на разных стадиях развития туберкулезной инфекции является в современных исследованиях перспективным [211].

С целью определения значимости различных туберкулезных антигенов при развитии туберкулезной инфекции у детей и их качественной и количественной оценке нами были проведены исследования 310 пациентов в возрасте до 18 лет. Пациенты были разделены на три группы в зависимости от разной степени выраженности туберкулезной инфекции: 1-я – 110 детей с установленным диагнозом ТБ (группа «ТБ»), 2-я – 156 детей с ЛТИ (группа «ЛТИ»), 3-я – 44 ребенка НТ (группа «НТ»). Дополнительно из 1-й группы было выделено две подгруппы: 1-я – 86 детей с первичными формами ТБ (группа «ТБ1») и 2-я – 24 ребенка с вторичными формами ТБ (группа «ТБ2»). Дополнительно из 2-й группы было выделено две подгруппы: 1-я – 75 детей в РППТИ (группа «РППТИ») и 2-я – 81 ребенок, инфицированный МБТ более года (группа «Т»). Дополнительно из 3-й группы было выделено две подгруппы: 1-я – 21 ребенок с ПВА (группа «ПВА») и 2-я – 23 ребенка с ПТА (группа «ПТА»).

Количественную оценку специфических антигенов проводили при постановке тестов *in vitro* иммуноферментного анализа для определения индуцированного ИФН- γ в цельной крови (после 72-часовой индукции специфическими антигенами ППД-Л, CFP32B, Rv2660c, ESAT6, 85a, ESAT6-CFP10) по и.с. и в пг/мл [104].

6.1. Оценка уровня ИФН- γ , индуцированного ППД-Л, и его значимость при развитии туберкулезной инфекции у детей

До настоящего времени наиболее часто в качестве специфического митогена использовался туберкулин (ППД), который состоит из сотен различных белков МБТ [196; 286] (более 90%, [406]), но только в последние годы появилась возможность провести протеомную оценку ППД и определить его молекулярный состав. При этом текущий анализ состояния ППД, в дополнение к описанию кандидатов (антигенов) следующего поколения ППД, основанных на использовании индивидуального белка или белковых коктейлей, не позволил сделать однозначный выбор в пользу отказа от данного митогена [480]. Поэтому с целью уточнения значимости антигена в индукции ИФН- γ при развитии туберкулезной инфекции у детей ППД-Л был включен в наше исследование. Уровень продукции индуцированного ИФН- γ с ППД-Л (пг/мл) у детей исследуемых групп представлен в таблице 6.1.

Таблица 6.1 – Уровень продукции индуцированного ИФН- γ с ППД-Л (пг/мл) у детей исследуемых групп

Группы	n	ИФН- γ с ППД-Л (пг/мл)		Критерий Манна-Уитни (U), p^1	Критерий Манна-Уитни (U), p^2	Критерий Манна-Уитни (U), p^3
		ME	Q _{25%} :Q _{75%}			
ТБ*	110	1885,7	711,0:1297,0	-	U=11771; $p<0,0001$	U=140; $p<0,0001$
ЛТИ*	156	839,1	288,5:1163,0	U=11771; $p<0,0001$	-	U=483,5; $p<0,0001$
НТ*	44	108,2	15,6:96,5	U=140; $p<0,0001$	U=483,5; $p<0,0001$	-

Примечание: *ТБ – группа с установленным диагнозом туберкулез; ЛТИ – группа с латентной туберкулезной инфекцией; НТ – группа не инфицированных МБТ.

- 1- Различия между группой ТБ и группами ЛТИ, НТ,
- 2- Различия между группой ЛТИ и группами ТБ, НТ,
- 3- Различия между группой НТ и группами ТБ, ЛТИ.

По результатам исследования уровень ИФН- γ (пг/мл) среди детей группы «ТБ» статистически значимо отличался от показателей детей группы «ЛТИ» ($p<0,0001$) и «НТ» ($p<0,0001$) и был выше, что позволило говорить о выраженных

иммунных реакциях, характеризующих активность туберкулезной инфекции. Несмотря на определение ППД-Л во всех группах, именно количественная оценка позволила установить разный уровень выраженности иммунного ответа в зависимости от стадии туберкулезной инфекции (Критерий Краскела-Уоллиса $H=109,913$; $p=0,000$).

При определении и.с. в группах «ТБ» (и.с.= $27,6 \pm 3,7$; $Q_{25\%}:Q_{75\%}$ 10,9:22,7), «ЛТИ» (и.с.= $12,4 \pm 1,3$; $Q_{25\%}:Q_{75\%}$ 4,2:14,6) и «НТ» (и.с.= $1,8 \pm 0,5$; $Q_{25\%}:Q_{75\%}$ 0,3:1,75) также установили значимые различия ($H=112,32$; $p=0,000$), свидетельствующие о разной степени активности туберкулезной инфекции.

Сравнивая показатели (и.с.) у детей, больных ТБ, в зависимости от генеза заболевания, не установили достоверных различий ($U=865$; $p=0,227$), так, у детей группы «ТБ1» продукция индуцированного цитокина регистрировалась на уровне $30,0 \pm 4,6$ ($n=86$, $Q_{25\%}:Q_{75\%}$ 12:23,7), показатель детей группы «ТБ2» был на уровне $19,0 \pm 4,6$ ($n=24$, $Q_{25\%}:Q_{75\%}$ 7,9:20,6) (рисунок 6.1), что свидетельствовало о сохранении выраженного иммунного ответа на ППД-Л как при развитии первичных, так и вторичных форм ТБ у детей.

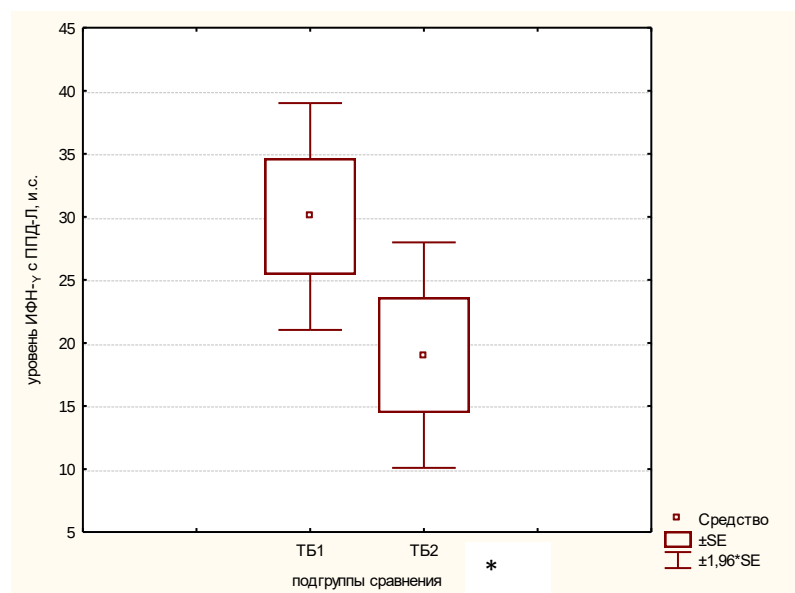


Рисунок 6.1 – Уровень индуцированного ИФН-γ с ППД-Л у детей, больных туберкулезом (и.с.)

Примечание: *ТБ1 – группа детей с первичными формами туберкулеза; ТБ2 – группа детей с вторичными формами туберкулеза

Сравнивая уровень индуцированного ИФН- γ с ППД-Л у детей группы «ТБ1» в фазе инфильтрации ($n=57$, $28,7 \pm 6,3$; $Q_{25\%}:Q_{75\%}$ 11,4:21,8) и в фазе кальцинации ($n=29$, $32,7 \pm 5,7$; $Q_{25\%}:Q_{75\%}$ 15,1:27,7), были установлены различия ($U=1056$; $p=0,036$), что могло свидетельствовать, с одной стороны, о восстановлении клеточного иммунного ответа, с другой – о сохранении активности инфекции.

Результаты и.с. индуцированного ИФН- γ с ППД-Л в группах сравнения представлены на рисунке 6.2 ($N=127,78$; $p=0,000$).

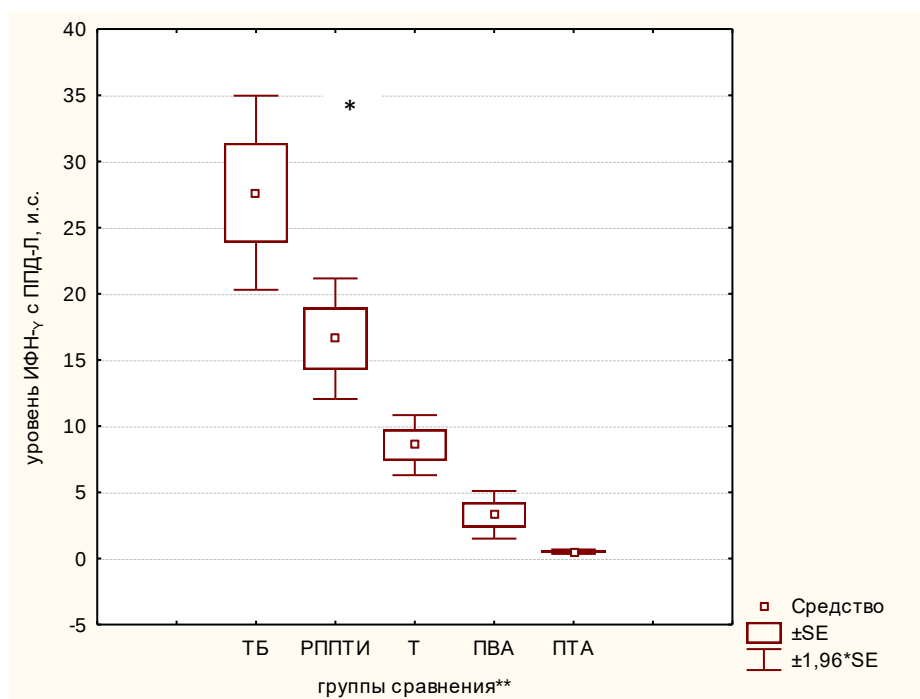


Рисунок 6.2 – Уровень индуцированного ИФН- γ с ППД-Л у детей в группах сравнения (и.с.)

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

**группы сравнения: ТБ – группа с установленным диагнозом туберкулез; РПТИ – 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.

Анализ результатов в группах сравнения показал наличие статистически значимых различий по критерию Краскела-Уоллиса, при этом данный критерий не позволил определить, между какими группами эти различия существуют, что потребовало проведения апостериорных (множественных) сравнений с помощью критерия Манна-Уитни (таблица 6.2).

Таблица 6.2 – Уровень продукции индуцированного ИФН- γ с ППД-Л (и.с.) у детей групп сравнения

Группы	n	ИФН- γ с ППД-Л (и.с.)		Критерий Манна-Уитни (U), p^1	Критерий Манна-Уитни (U), p^2	Критерий Манна-Уитни (U), p^3	Критерий Манна-Уитни (U), p^4
		ME $\pm$ SEM	Q _{25%} :Q _{75%}				
ТБ*	110	27,6 $\pm$ 3,7	10,9:22,7	-	U=3010; $p=0,0018$	U=1806,5; $p<0,0001$	U=181,5; $p<0,0001$
РППТИ*	75	16,6 $\pm$ 2,3	6,5:18,7	U=3010; $p=0,0018$	-	U=4231,5; $p<0,0001$	U=200,5; $p<0,0001$
Т*	81	8,6 $\pm$ 1,2	3,1:11,6	U=1806,5; $p<0,0001$	U=4231,5; $p<0,0001$	-	U=380; $p<0,0001$
ПВА*	21	3,3 $\pm$ 0,9	1,1:3,7	U=181,5; $p<0,0001$	U=200,5; $p<0,0001$	U=380; $p<0,0001$	-
ПТА*	23	0,5 $\pm$ 0,08	0,2:0,7	U=21,5; $p<0,0001$	U=33,5; $p<0,0001$	U=21,5; $p<0,0001$	U=409,5; $p<0,0001$

Примечание: *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.

- 1- Различия между группой ТБ и группами РППТИ, Т, ПВА и ПТА,
- 2- Различия между группой РППТИ и группами ТБ, Т, ПВА и ПТА,
- 3- Различия между группой Т и группами ТБ, РППТИ, ПВА и ПТА,
- 4- Различия между группой ПВА и группами ТБ, РППТИ, Т и ПТА

В группах сравнения полученные результаты индуцированного ИФН- γ с ППД-Л (и.с.) значительно различались, отражая разную степень выраженности иммунного ответа при развитии туберкулезной инфекции у детей, так, показатель среди детей группы «ТБ» был достоверно выше ($p=0,0018$), чем в группе «РППТИ», у детей группы «РППТИ» показатель был выше ($p<0,0001$), чем в группе «Т», у детей группы «Т» значимо выше ($p<0,0001$), чем в группе «ПВА», а у детей группы «ПВА» выше ($p<0,0001$), чем в группе «ПТА».

Учитывая референсные значения показателя уровня индуцированного ИФН- γ с ППД-Л (и.с. $\leq 1,0$ оценили как отрицательный результат (< 90 пг/мл), выше 1,0 – как положительный), оценили частоту положительных результатов в исследуемых группах.

По результатам нашего исследования, с одинаковой частотой регистрировали положительные результаты среди детей групп «ЛТИ» (148; 94,9%) и «ТБ» (107; 97,3%) ($p=0,621$), чуть реже – среди лиц группы «ПВА» (18; 85,7%).

Таким образом, нами установлено, что в современных условиях может быть значимо применение ППД-Л в качестве индуктора (митогена) для общей оценки уровня выраженности специфического иммунного ответа, при этом возможны трудности в правильной интерпретации полученных результатов, учитывая частоту встречаемости положительных результатов у лиц с ПВА за счет перекрестной реактивности между МБТ и БЦЖ [480]. Дифференцированный подход в оценке отдельных специфических белков, по нашему мнению, в дальнейшем позволит выбрать наиболее значимые для диагностики туберкулезной инфекции на разных стадиях ее развития.

6.2. Оценка уровня индуцированного ИФН- γ с ESAT6-CFP10 и его значимость при развитии туберкулезной инфекции у детей

Перспективными для диагностики туберкулезной инфекции, по оценке многих исследователей, являются низкомолекулярные секретируемые белки CFP10 и ESAT6 [206; 290; 332; 344; 418; 480], оба кодируются по регионам разности 1 (RD1), которые присутствуют в *M. tuberculosis* и *M. bovis*, но которые отсутствуют в *M. bovis* BCG. Важность этих рекомбинантных антигенов состоит в способности к иммунному распознаванию с помощью Т-клеток, специфичных для туберкулезной инфекции. Они являются основными компонентами новых диагностических тестов и предназначены для обнаружения скрытой туберкулезной инфекции у людей [211]. Мы также в своих исследованиях провели оценку гибридного белка ESAT6-CFP10 в качестве индуктора ИФН- γ . Уровень индуцированного ИФН- γ с ESAT6-CFP10 (пг/мл) у детей исследуемых групп представлен в таблице 6.3.

Таблица 6.3 – Уровень индуцированного ИФН- γ с ESAT6-CFP10 (пг/мл) у детей исследуемых групп

Группы	n	ИФН- γ с ESAT6-CFP10 (пг/мл)		Критерий Манна-Уитни (U), p^1	Критерий Манна-Уитни (U), p^2	Критерий Манна-Уитни (U), p^3
		ME	$Q_{25\%}:Q_{75\%}$			
ТБ*	110	501,7	103,0:915,0	-	$U=14479$; $p=0,000$	$U=444,5$; $p<0,0001$
ЛТИ*	156	75,0	9,1:39,0	$U=14479$; $p=0,000$	-	$U=2793$; $p=0,059$
НТ*	44	17,8	7,6:16,9	$U=444,5$; $p<0,0001$	$U=2793$; $p=0,059$	-

Примечание: *ТБ – группа с установленным диагнозом туберкулез; ЛТИ – группа с латентной туберкулезной инфекцией; НТ – группа не инфицированных МБТ.

- 1- Различия между группой ТБ и группами ЛТИ, НТ,
- 2- Различия между группой ЛТИ и группами ТБ, НТ,
- 3- Различия между группой НТ и группами ТБ, ЛТИ.

Анализ результатов исследования показал, что среди детей группы «ТБ» уровень индуцированного ИФН- γ с ESAT6-CFP10 (пг/мл) статистически значимо отличался от показателей детей группы «ЛТИ» ($p=0,000$) и «НТ» ($p<0,0001$), это позволило нам утверждать, что выраженный иммунный ответ на гибридный белок свидетельствовал об активности туберкулезной инфекции. Не было установлено значимых различий в группах «ЛТИ» и «НТ», что снижало значимость антигена для дифференциальной диагностики ЛТИ.

При сравнении уровня и.с. индуцированного ИФН- γ с ESAT6-CFP10 в группах «ТБ» (и.с.= $7,3\pm 0,8$; $Q_{25\%}:Q_{75\%}$ 1,4:9,8), «ЛТИ» (и.с.= $0,9\pm 0,2$; $Q_{25\%}:Q_{75\%}$ 0,2:0,4) и «НТ» (и.с.= $0,3\pm 0,04$; $Q_{25\%}:Q_{75\%}$ 0,2:0,3) установили значимые различия показателей этих групп ($H=121,5$; $p=0,000$).

Сопоставляя показатели (и.с.) индуцированного ИФН- γ с ESAT6-CFP10 у детей, больных ТБ, в зависимости от форм заболевания, установили достоверные различия ($U=719$; $p=0,023$), так, у детей группы «ТБ1» продукция индуцированного цитокина регистрировалась на уровне $8,1\pm 0,9$ ($n=86$, $Q_{25\%}:Q_{75\%}$ 2,2:11,4), показатель детей группы «ТБ2» был на уровне $4,3\pm 1,1$ ($n=24$, $Q_{25\%}:Q_{75\%}$ 0,55:6,8) (рисунок 6.3).

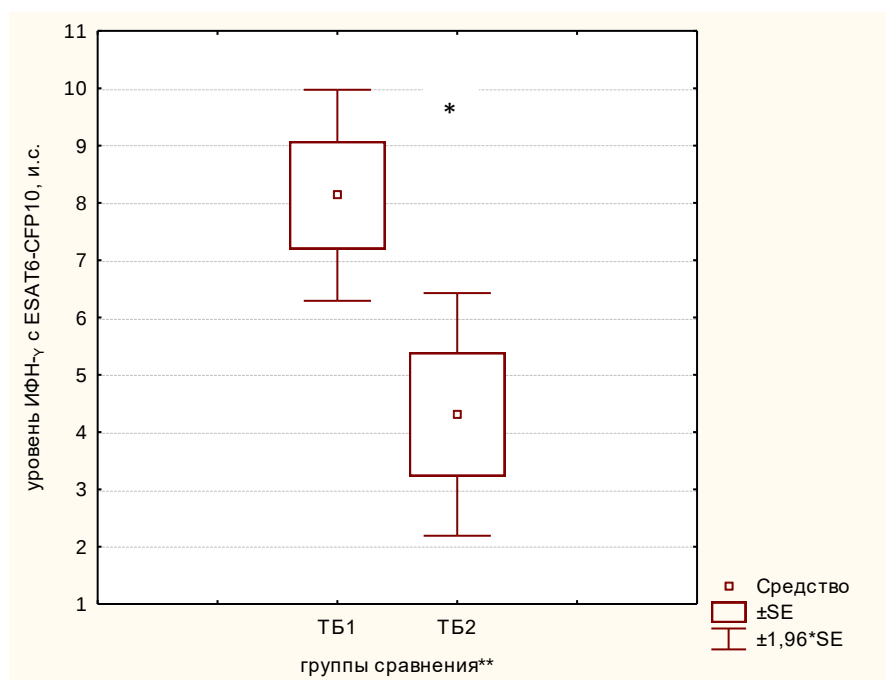


Рисунок 6.3 – Уровень индуцированного ИФН-γ с ESAT6-CFP10 у детей, больных туберкулезом (и.с.)

Примечание: * $p=0,023$ (критерий Манна-Уитни)

**ТБ1 – группа детей с первичными формами туберкулеза; ТБ2 – группа детей с вторичными формами туберкулеза

Полученные результаты позволили нам говорить о снижении выраженности специфического иммунного ответа (связанного с гибридным белком ESAT6-CFP10) при развитии вторичных форм ТБ у детей.

Сравнивая уровень индуцированного ИФН-γ с ESAT6-CFP10 у детей группы «ТБ1» в фазе инфильтрации ($n=57$, $6,7 \pm 1,1$; $Q_{25\%}:Q_{75\%}$ 1,4:7,2) и в фазе кальцинации ($n=29$, $10,9 \pm 1,6$; $Q_{25\%}:Q_{75\%}$ 3,5:18,7), были установлены достоверные различия ($U=1098$; $p=0,013$), что свидетельствовало, с одной стороны, о восстановлении клеточного ответа, с другой, – о сохранении активности инфекции.

Результаты индекса стимуляции индуцированного ИФН-γ с ESAT6-CFP10 в группах сравнения представлены на рисунке 6.4 ($H=125,6$; $p=0,000$).

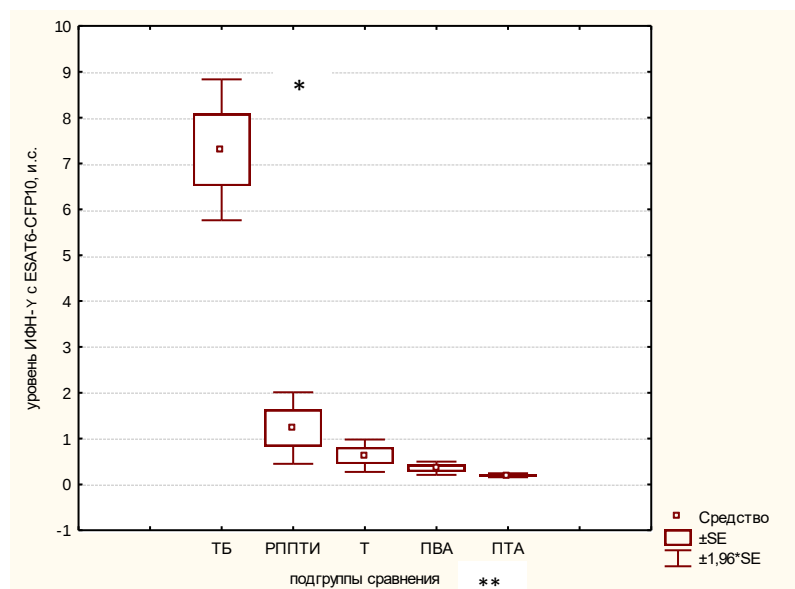


Рисунок 6.4 – Уровень индуцированного ИФН-γ с ESAT6-CFP10 у детей в группах сравнения (и.с.)

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.

Полученные результаты в группах сравнения потребовали уточнения достоверности различий между группами (таблица 6.4).

Таблица 6.4 – Уровень индуцированного ИФН-γ с ESAT6-CFP10 (и.с.) у детей групп сравнения

Группы	n	ИФН-γ с ESAT6-CFP10 (и.с.)		Критерий Манна-Уитни (U), p^1	Критерий Манна-Уитни (U), p^2	Критерий Манна-Уитни (U), p^3	Критерий Манна-Уитни (U), p^4
		ME±SEM	Q _{25%:} Q _{75%}				
ТБ*	110	7,3±0,8	1,4:9,8	-	U=1291,5; $p<0,0001$	U=999,5; $p<0,0001$	U=225; $p<0,0001$
РППТИ*	75	1,2±0,4	0,2:1,0	U=1291,5; $p<0,0001$	-	U=3542,5; $p=0,073$	U=687,5; $p=0,375$
Т*	81	0,6±0,2	0,2:0,3	U=999,5; $p<0,0001$	U=3542,5; $p=0,073$	-	U=958,5; $p=0,371$
ПВА*	21	0,4±0,07	0,2:0,3	U=225; $p<0,0001$	U=687,5; $p=0,375$	U=958,5; $p=0,371$	-
ПТА*	23	0,2±0,02	0,2:0,2	U=186,5; $p<0,0001$	U=638; $p=0,060$	U=907,5; $p=0,851$	U=294; $p=0,217$

Примечание: *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.

- 1- Различия между группой ТБ и группами РППТИ, Т, ПВА и ПТА,
- 2- Различия между группой РППТИ и группами ТБ, Т, ПВА и ПТА,
- 3- Различия между группой Т и группами ТБ, РППТИ, ПВА и ПТА,
- 4- Различия между группой ПВА и группами ТБ, РППТИ, Т и ПТА

Так, показатель у детей группы «ТБ» был достоверно выше, чем в группах сравнения. У детей групп «РППТИ», «Т», «ПВА» и «ПТА» показатели значимо не различались, что снижало значимость антигена для дифференциальной диагностики туберкулезной инфекции. Сравнивая выраженность иммунного ответа на разных стадиях туберкулезной инфекции, полученные результаты уровня индуцированного ИФН- γ с ESAT6-CFP10 (и.с.) позволили нам говорить о значимости гибридного белка на этапе активной туберкулезной инфекции.

Установленные референсные значения уровня ИФН- γ для ESAT6-CFP10 (и.с. $\leq 1,0$ оценили как отрицательный результат (<100 пг/мл), выше 1,0 – как положительный) позволили оценить частоту положительных результатов в исследуемых группах.

Анализируя частоту положительных результатов ИФН- γ после стимуляции ESAT6-CFP10 установили, что чаще они регистрировались у детей группы «ТБ» (87; 79,1%), чем у детей группы «ЛТИ» (24; 15,4%) ($p < 0,0001$). Среди детей группы «НТ» положительные результаты не регистрировались.

Таким образом, результаты оценки гибридного белка ESAT6-CFP10 позволили нам рассматривать его в качестве маркера активной туберкулезной инфекции, преимущественно на стадии развития заболевания или высокого риска туберкулеза.

6.3. Оценка уровня индуцированного ИФН- γ белками ранней стадии туберкулезной инфекции (ESAT6, 85a) и их значимость при развитии специфического процесса у детей

Среди ранее изученных специфических белков МБТ в настоящее время для дальнейшего исследования представляют интерес два: ESAT6 и 85a.

Так, среди факторов, оказывающих непосредственное воздействие на организм хозяина для подавления защитных механизмов, рассматривается белок ESAT6. При этом результаты исследований по данному антигену весьма противоречивы [202; 381; 387], с одной стороны, его можно было бы рассматривать в качестве маркера латентной туберкулезной инфекции [234], с другой – маркером активного специфического процесса [387].

Учитывая полученные противоречивые данные о ESAT6 при развитии туберкулезной инфекции, мы провели исследование среди детей с разной степенью выраженности туберкулезной инфекции. Оценивая уровень ИФН- γ после индукции ESAT6 (пг/мл), установили значимые различия в результатах групп сравнения: «ТБ», «ЛТИ» и «НТ» ($N=14,274$; $p=0,003$) (таблица 6.5).

Таблица 6.5 – Уровень индуцированного ИФН- γ с ESAT6 (пг/мл) у детей исследуемых групп

Группы	n	ИФН- γ с ESAT6 (пг/мл)		Критерий Манна-Уитни (U), p^1	Критерий Манна-Уитни (U), p^2	Критерий Манна-Уитни (U), p^3
		ME	$Q_{25\%}:Q_{75\%}$			
ТБ*	110	100,9	11,4:125,0	-	$U=7029$; $p=0,019$	$U=1274,5$; $p=0,255$
ЛТИ*	108	178,7	18,0:216,0	$U=7029$; $p=0,019$	-	$U=940$; $p=0,004$
НТ*	27	43,0	10,8:60,0	$U=1274,5$; $p=0,255$	$U=940$; $p=0,004$	-

Примечание: *ТБ – группа с установленным диагнозом туберкулез; ЛТИ – группа с латентной туберкулезной инфекцией; НТ – группа не инфицированных МБТ.

1- Различия между группой ТБ и группами ЛТИ, НТ,

2- Различия между группой ЛТИ и группами ТБ, НТ,

3- Различия между группой НТ и группами ТБ, ЛТИ.

Так, среди детей группы «ТБ» уровень индуцированного ИФН- γ (пг/мл) был ниже и статистически значимо отличался от показателей детей группы «ЛТИ» ($p=0,019$). Не было установлено различий в показателях у детей из групп «НТ» и «ТБ» ($p=0,255$).

При определении уровня и.с. индуцированного ИФН- γ с ESAT6 в группах «ТБ» ($n=110$, и.с.= $1,1 \pm 0,1$; $Q_{25\%}:Q_{75\%}$ 0,2:1,6), «ЛТИ» ($n=108$, и.с.= $2,6 \pm 0,5$;

$Q_{25\%}:Q_{75\%}$ 0,2:2,7) и «НТ» ($n=27$, и.с.= $0,7\pm 0,15$; $Q_{25\%}:Q_{75\%}$ 0,2:0,9) также установили значимые различия ($H=7,038$; $p=0,030$).

Таким образом, полученные нами данные позволили предположить, что антиген ESAT6 может рассматриваться в качестве маркера ЛТИ.

Уточняя роль ESAT6 при развитии заболевания, сравнили показатели (и.с.) у детей группы «ТБ» в зависимости от генеза заболевания. Были установлены достоверные различия ($U=752,5$; $p=0,043$), так, у детей группы «ТБ1» продукция индуцированного ИФН- γ регистрировалась на уровне $1,25\pm 0,2$ ($n=86$, $Q_{25\%}:Q_{75\%}$ 0,3:1,7), показатель детей группы «ТБ2» был на уровне $0,7\pm 0,2$ ($n=24$, $Q_{25\%}:Q_{75\%}$ 0,1:0,7) (рисунок 6.5).

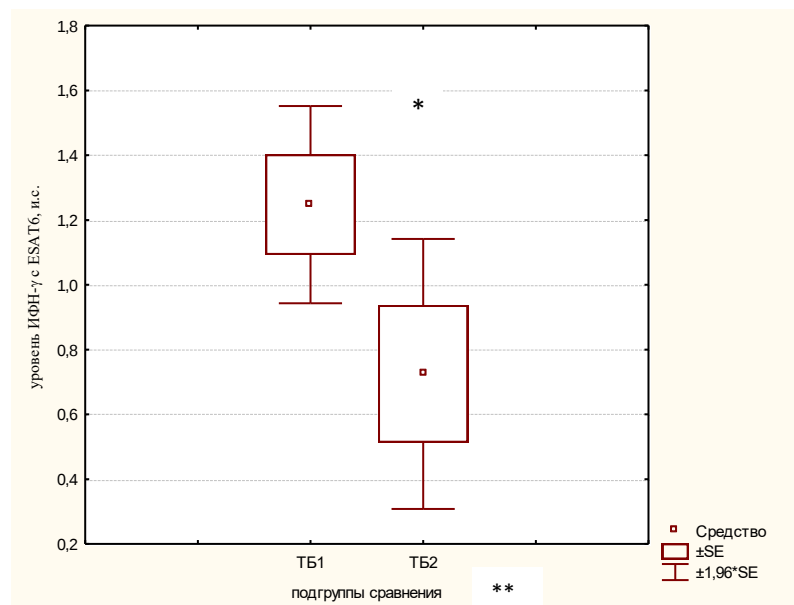


Рисунок 6.5 – Уровень индуцированного ИФН- γ с ESAT6 у детей, больных туберкулезом (и.с.)

Примечание: * $p=0,043$ (критерий Манна-Уитни)

**ТБ1 – группа детей с первичными формами туберкулеза; ТБ2 – группа детей с вторичными формами туберкулеза

Сравнивая уровень индуцированного ИФН- γ с ESAT6 у детей группы «ТБ1» в фазе инфильтрации ($n=57$, $1,2\pm 0,2$; $Q_{25\%}:Q_{75\%}$ 0,3:1,7) и в фазе кальцинации ($n=29$, $1,3\pm 0,3$; $Q_{25\%}:Q_{75\%}$ 0,2:1,7), в показателях различий не было установлено ($U=786$; $p=0,711$).

Таким образом, сохранение иммунного ответа на ESAT6 у пациентов при развитии первичных форм заболевания свидетельствовало о более благоприятном его течении и подтверждало протективную роль белка.

Уточняя место изучаемого белка при развитии ЛТИ, провели оценку уровня индуцированного ИФН- γ с ESAT6 в группах сравнения. Результаты уровня и.с. в группах сравнения представлены на рисунке 6.6 (N=30,486; p=0,000).

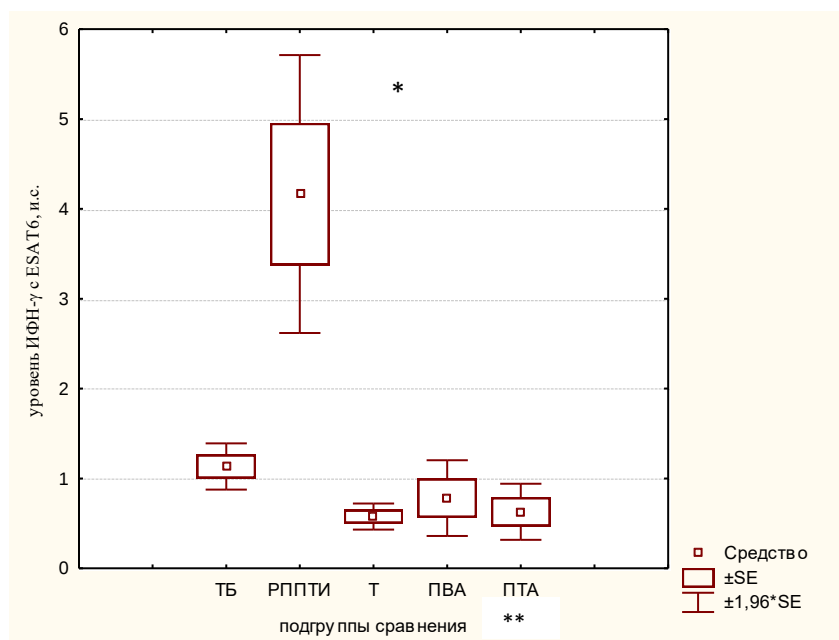


Рисунок 6.6 – Уровень индуцированного ИФН- γ с ESAT6 у детей в группах сравнения (и.с.)

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.

Полученные результаты потребовали уточнения, между какими группами имелись значимые различия (таблица 6.6).

Таблица 6.6 – Уровень индуцированного ИФН- γ с ESAT6 (и.с.) у детей групп сравнения

Группы	n	ИФН- γ с ESAT6 (и.с.)		Критерий Манна-Уитни (U), p ¹	Критерий Манна-Уитни (U), p ²	Критерий Манна-Уитни (U), p ³	Критерий Манна-Уитни (U), p ⁴
		ME $\pm$ SEM	Q _{25%} :Q _{75%}				
ТБ*	110	1,1 $\pm$ 0,1	0,2:1,6	-	U=4729; p=0,000	U=2262; p=0,216	U=862; p=0,605
РППТИ*	61	4,2 $\pm$ 0,8	0,5:4,2	U=4729; p=0,000	-	U=647; p=0,000	U=264,5; p=0,002
Т*	47	0,6 $\pm$ 0,07	0,2:0,8	U=2262; p=0,216	U=647; p=0,000	-	U=419,5; p=0,761
ПВА*	17	0,8 $\pm$ 0,2	0,2:0,8	U=862; p=0,605	U=264,5; p=0,002	U=419,5; p=0,761	-
ПТА*	10	0,6 $\pm$ 0,2	0,2:0,9	U=511; p=0,711	U=148,5; p=0,01	U=255; p=0,675	U=86,5; p=0,940

Примечание: *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.

- 1- Различия между группой ТБ и группами РППТИ, Т, ПВА и ПТА,
- 2- Различия между группой РППТИ и группами ТБ, Т, ПВА и ПТА,
- 3- Различия между группой Т и группами ТБ, РППТИ, ПВА и ПТА,
- 4- Различия между группой ПВА и группами ТБ, РППТИ, Т и ПТА.

Показатель индуцированного ИФН- γ с ESAT6 у детей группы «ТБ» был достоверно ниже ($p=0,000$), чем в группе «РППТИ». У детей группы «РППТИ» показатель был достоверно выше, чем в группе «Т» ($p=0,000$), «ПВА» ($p=0,002$) и «ПТА» ($p=0,01$), при этом показатели значимо не различались между группой «ТБ» и группами «Т», «ПВА» и «ПТА» ($H=1,667$; $p=0,664$). В группах сравнения полученные результаты уровня индуцированного ИФН- γ с ESAT6 (и.с.) по значимости не были сопоставимы с результатами после индукции гибридным белком (что позволило предположить об изменении антигенных свойств ESAT6 при сочетании с CFP10).

Таким образом, полученные результаты индуцированного ИФН- γ с ESAT6 более четко показали «место белка на спектре» туберкулезной инфекции, а именно на раннем этапе развития первичной туберкулезной инфекции в качестве специфического белка, участвующего в формировании адаптивного иммунитета.

Полученные референсные значения ИФН- γ для ESAT6 (и.с. $\leq 2,0$ оценили как отрицательный результат (< 150 пг/мл), и.с. выше 2,0 – как положительный)

позволили оценить частоту положительных результатов у детей с разной степенью выраженности туберкулезной инфекции.

Установили, что положительные результаты индуцированного ИФН- γ с ESAT6 чаще регистрировались у детей группы «ЛТИ», чем у пациентов группы «ТБ» ($p=0,05$).

Таким образом, результаты анализа по специфическому белку ESAT6 позволили нам рассматривать его в качестве маркера ЛТИ на этапе ее раннего периода при первичном инфицировании МБТ.

Основной антигенной фракцией фильтрата культур МБТ является комплекс Ag85, который проявляет высокую перекрестную реактивность с антигенами практически всех МБТ, поэтому считается, что Ag85 не позволяет проводить различия между активной и ЛТИ [387; 478], тем не менее в настоящее время изучается возможность его применения.

Мы также провели оценку специфического антигена 85а, при этом установили значимые различия в результатах уровня ИФН- γ после индукции Ag85а (пг/мл) в группах сравнения «ТБ», «ЛТИ» и «НТ» ($N=28,836$; $p=0,000$) (таблица 6.7).

Таблица 6.7 – Уровень индуцированного ИФН- γ с Ag85а (пг/мл) у детей исследуемых групп

Группы	n	ИФН- γ с Ag85а (пг/мл)		Критерий Манна-Уитни (U), p^1	Критерий Манна-Уитни (U), p^2	Критерий Манна-Уитни (U), p^3
		ME	Q _{25%} :Q _{75%}			
ТБ*	109	57,1	0,2:47,0	-	U=7685; $p=0,000$	U=1870; $p=0,030$
ЛТИ*	104	119,9	10,8:108,0	U=7685; $p=0,000$	-	U=1120; $p=0,093$
НТ*	27	64,7	10,9:43,0	U=1870; $p=0,030$	U=1120; $p=0,093$	-

Примечание: *ТБ – группа с установленным диагнозом туберкулез; ЛТИ – группа с латентной туберкулезной инфекцией; НТ – группа не инфицированных МБТ.

- 1- Различия между группой ТБ и группами ЛТИ, НТ,
- 2- Различия между группой ЛТИ и группами ТБ, НТ,
- 3- Различия между группой НТ и группами ТБ, ЛТИ.

Так, среди детей группы «ТБ» уровень индуцированного ИФН- γ (пг/мл) был ниже и статистически значимо отличался от показателей детей группы «ЛТИ» ($p=0,000$) и «НТ» ($p=0,030$). Не было установлено значимых различий между показателями в группе «ЛТИ» и «НТ» ($p=0,093$).

При определении уровня и.с. индуцированного ИФН- γ с Ag85a в группах «ТБ» ($n=109$, и.с. $=0,9\pm0,1$; $Q_{25\%}:Q_{75\%}$ 0,1:1,1), «ЛТИ» ($n=104$, и.с. $=1,9\pm0,4$; $Q_{25\%}:Q_{75\%}$ 0,2:2,05) и «НТ» ($n=27$, и.с. $=1,3\pm0,9$; $Q_{25\%}:Q_{75\%}$ 0,2:0,5) также установили значимые различия ($H=7,151$; $p=0,028$).

Полученные результаты позволили нам говорить о данном антигене как о белке, характеризующем больше латентную стадию туберкулезной инфекции, чем активную инфекцию.

Дополнительно определяя вклад Ag85a в оценку активной туберкулезной инфекции, сравнили показатели индуцированного ИФН- γ с Ag85a (и.с.) у детей группы «ТБ» в зависимости от форм заболевания, при этом не было установлено достоверных различий ($U=1010,5$; $p=0,945$), так, у детей группы «ТБ1» продукция индуцированного ИФН- γ регистрировалась на уровне $0,9\pm0,2$ ($n=85$, $Q_{25\%}:Q_{75\%}$ 0,1:1,1), показатель детей группы «ТБ2» был на уровне $0,8\pm0,2$ ($n=24$, $Q_{25\%}:Q_{75\%}$ 0,2:0,95). Сравнивая уровень индуцированного ИФН- γ с Ag85a у детей группы «ТБ1» в фазе инфильтрации ($n=56$, $0,8\pm0,2$; $Q_{25\%}:Q_{75\%}$ 0,15:1,05) и в фазе кальцинации ($n=29$, $1,2\pm0,3$; $Q_{25\%}:Q_{75\%}$ 0,1:1,5), различий не было установлено ($U=858,5$; $p=0,666$).

Таким образом, полученные результаты позволили нам говорить об отсутствии значимости Ag85a в качестве маркера активной туберкулезной инфекции.

С целью уточнения роли Ag85a для ЛТИ сравнили результаты уровня и.с. индуцированного ИФН- γ с Ag85a в группах сравнения, которые представлены на рисунке 6.7 ($H=19,986$; $p=0,0005$).

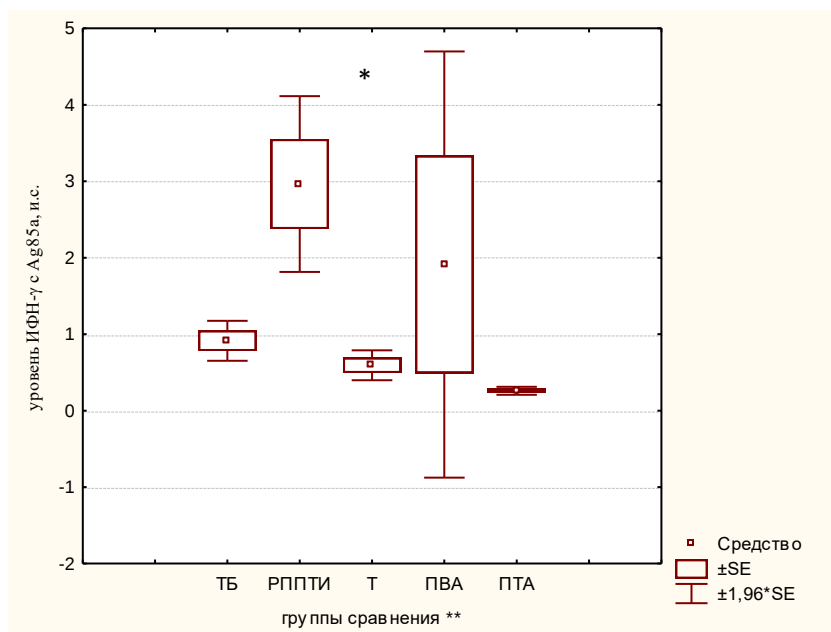


Рисунок 6.7 – Уровень индуцированного ИФН-γ с Ag85а у детей в группах сравнения (и.с.)

Примечание: * $p=0,0005$ (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.

Анализ результатов показал наличие достоверных различий показателей в группах сравнения, что также потребовало уточнения, между какими группами имелись различия уровня индуцированного ИФН-γ с Ag85а (таблица 6.8).

Таблица 6.8 – Уровень индуцированного ИФН-γ с Ag85а (и.с.) у детей групп сравнения

Группы	n	ИФН-γ с Ag85а (и.с.)		Критерий Манна-Уитни (U), p^1	Критерий Манна-Уитни (U), p^2	Критерий Манна-Уитни (U), p^3	Критерий Манна-Уитни (U), p^4
		ME±SEM	Q _{25%} :Q _{75%}				
ТБ*	109	0,9±0,1	0,1:1,1	-	U=4346; $p=0,0002$	U=2371,5; $p=0,748$	U=970,5; $p=0,753$
РППТИ*	59	3,0±0,6	0,3:3,4	U=4346; $p=0,0002$	-	U=789; $p=0,0004$	U=333,5; $p=0,036$
Т*	45	0,6±0,1	0,2:0,8	U=2371,5; $p=0,748$	U=789; $p=0,0004$	-	U=405,5; $p=0,717$
ПВА*	17	1,9±1,4	0,2:0,8	U=970,5; $p=0,753$	U=333,5; $p=0,036$	U=405,5; $p=0,717$	-
ПТА*	10	0,3±0,03	0,2:0,3	U=453; $p=0,378$	U=129; $p=0,005$	U=176; $p=0,285$	U=61; $p=0,228$

Примечание: *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.

- 1- Различия между группой ТБ и группами РППТИ, Т, ПВА и ПТА,
- 2- Различия между группой РППТИ и группами ТБ, Т, ПВА и ПТА,
- 3- Различия между группой Т и группами ТБ, РППТИ, ПВА и ПТА,
- 4- Различия между группой ПВА и группами ТБ, РППТИ, Т и ПТА

По результатам индуцированного ИФН- γ с Ag85a (и.с.) установили, что у детей группы «ТБ» показатели были достоверно ниже ($p=0,0002$), чем в группе «РППТИ». У детей группы «РППТИ» показатель был достоверно выше, чем в группе «Т» ($p=0,0004$), «ПВА» ($p=0,036$) и «ПТА» ($p=0,005$), при этом показатели значимо не различались между группой «ТБ» и группами «Т», «ПВА» и «ПТА» ($H=1,249$; $p=0,741$).

Таким образом, показатели индуцированного ИФН- γ с Ag85a позволяют рассматривать специфический антиген в качестве маркера раннего периода первичной туберкулезной инфекции.

Полученные референсные значения ИФН- γ для Ag85a (и.с. $\leq 1,0$ – отрицательный результат (< 85 пг/мл), и.с. выше 1,0 – положительный) позволили оценить частоту положительных результатов у детей с разной степенью выраженности туберкулезной инфекции.

Анализ положительных результатов индуцированного ИФН- γ с Ag85a показал, что достоверно чаще они регистрировались у детей из группы «РППТИ» (29; 49,2%) ($p=0,0005$), при этом среди детей группы «ТБ» (29; 26,6%), групп «Т» (8; 17,8%) и «ПВА» (3; 17,6%) регистрировались с одинаковой частотой ($p=0,421$).

Таким образом, по результатам наших исследований, антигены ESAT6 и 85a можно рассматривать в качестве маркеров ЛТИ на ее ранней стадии развития. При этом на Ag85a возможны реакции, обусловленные поствакцинальным иммунитетом, что снижает его значимость для дифференциальной диагностики туберкулезной инфекции у детей.

6.4. Оценка уровня индуцированного ИФН- γ с CFP32В и его значимость при развитии туберкулезной инфекции у детей

Одним из недавно идентифицированных антигенов является белок CFP32В. Установлено, что белок CFP32В стимулирует гуморальный ответ, поэтому можно предположить его роль в прогрессировании ТБ. При этом проводимые исследования ограничены и противоречивы, что не позволяет оценить роль данного белка на этапах развития туберкулезной инфекции, также необходимо учитывать, что ген данного белка обнаружен и в геноме БЦЖ [197; 199; 222; 233; 274; 368; 407; 433].

Учитывая возможную роль CFP32В в прогрессировании ТБ, данный специфический белок был выбран для нашего исследования. Оценивая уровень ИФН- γ после индукции CFP32В (пг/мл), мы установили значимые различия в показателях обследуемых групп: «ТБ», «ЛТИ» и «НТ» ($H=9,242$; $p=0,026$) (таблица 6.9).

Таблица 6.9 – Уровень индуцированного ИФН- γ с CFP32В (пг/мл) у детей исследуемых групп

Группы	n	ИФН- γ с CFP32В (пг/мл)		Критерий Манна-Уитни (U), p^1	Критерий Манна-Уитни (U), p^2	Критерий Манна-Уитни (U), p^3
		ME	$Q_{25\%}:Q_{75\%}$			
ТБ*	109	82,6	12,9:120,0	-	$U=6473$; $p=0,039$	$U=1305,5$; $p=0,151$
ЛТИ*	102	146,5	15,8:151,0	$U=6473$; $p=0,039$	-	$U=975,5$; $p=0,005$
НТ*	29	39,4	11,4:61,0	$U=1305,5$; $p=0,151$	$U=975,5$; $p=0,005$	-

Примечание: *ТБ – группа с установленным диагнозом туберкулез; ЛТИ – группа с латентной туберкулезной инфекцией; НТ – группа не инфицированных МБТ.

- 1- Различия между группой ТБ и группами ЛТИ, НТ,
- 2- Различия между группой ЛТИ и группами ТБ, НТ,
- 3- Различия между группой НТ и группами ТБ, ЛТИ.

Так, среди детей группы «ТБ» уровень ИФН- γ (пг/мл) был снижен и статистически значимо отличался от показателей детей только группы «ЛТИ» ($p=0,039$), не было установлено различий с «НТ» ($p=0,151$). Показатели группы

«ЛТИ» значительно различались по уровню выраженности иммунного ответа от показателей группы «НТ» ($p=0,005$).

При определении уровня и.с. в группах «ТБ» ($n=109$, и.с. $=1,0\pm0,1$; $Q_{25\%}:Q_{75\%}$ 0,2:1,6), «ЛТИ» ($n=102$, и.с. $=2,3\pm0,4$; $Q_{25\%}:Q_{75\%}$ 0,2:2,4) и «НТ» ($n=29$, и.с. $=0,7\pm0,15$; $Q_{25\%}:Q_{75\%}$ 0,2:1,1) также установили достоверные различия ($H=6,822$; $p=0,033$). Учитывая низкий иммунный ответ при стимуляции специфическим антигеном CFP32В на этапе развития заболевания и более выраженных реакциях на этапе ЛТИ, можно говорить о значимости данного белка в качестве маркера латентной, а не активной туберкулезной инфекции.

Сравнивая показатели уровня ИФН- γ после индукции CFP32В (и.с.) у детей группы «ТБ» в зависимости от формы заболевания, не установили достоверных различий ($U=905$; $p=0,400$), так, у детей группы «ТБ1» продукция индуцированного ИФН- γ регистрировалась на уровне $1,0\pm0,1$ ($n=85$, $Q_{25\%}:Q_{75\%}$ 0,2:1,8), показатель детей группы «ТБ2» был на уровне $0,9\pm0,2$ ($n=24$, $Q_{25\%}:Q_{75\%}$ 0,15:1,4). Уровень индуцированного ИФН- γ с CFP32В у детей группы «ТБ1» в фазе инфильтрации ($n=56$, $1,0\pm0,1$; $Q_{25\%}:Q_{75\%}$ 0,2:1,55) и в фазе кальцинации ($n=29$, $1,0\pm0,2$; $Q_{25\%}:Q_{75\%}$ 0,2:1,9) также не имел достоверных различий ($U=773$; $p=0,718$). Полученные результаты подтвердили низкую значимость белка CFP32В для оценки активности инфекции и ее прогрессировании у детей.

Для уточнения возможности применения CFP32В в качестве маркера ЛТИ оценили результаты и.с. индуцированного ИФН- γ с CFP32В в группах сравнения, которые представлены на рисунке 6.8 ($H=26,049$; $p=0,000$).

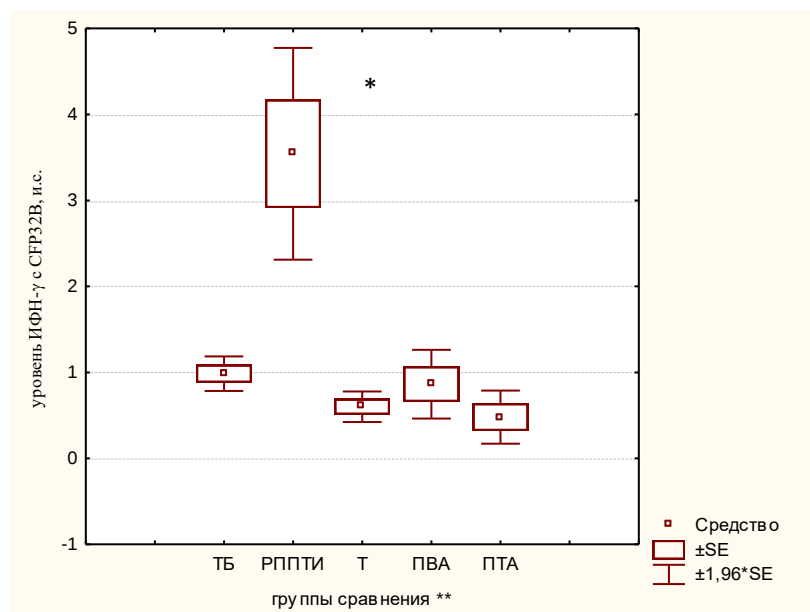


Рисунок 6.8 – Уровень индуцированного ИФН-γ с CFP32B у детей в группах сравнения (и.с.)

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.

Полученные результаты в группах сравнения потребовали уточнения, между какими группами имелись достоверные различия (таблица 6.10).

Таблица 6.10 – Уровень индуцированного ИФН-γ с CFP32B (и.с.) у детей групп сравнения

Группы	n	ИФН-γ с CFP32B (и.с.)		Критерий Манна-Уитни (U), p^1	Критерий Манна-Уитни (U), p^2	Критерий Манна-Уитни (U), p^3	Критерий Манна-Уитни (U), p^4
		ME±SEM	Q _{25%:} Q _{75%}				
ТБ*	109	1,0±0,1	0,2:1,6	-	U=4459,5; $p=0,000$	U=2062,5; $p=0,250$	U=1021,5; $p=0,925$
РППТИ*	59	3,5±0,6	0,4:3,8	U=4459,5; $p=0,000$	-	U=647,5; $p=0,000$	U=330; $p=0,007$
Т*	43	0,6±0,09	0,2:0,8	U=2062,5; $p=0,250$	U=647,5; $p=0,000$	-	U=458,5; $p=0,445$
ПВА*	19	0,9±0,2	0,2:1,2	U=1021,5; $p=0,925$	U=330; $p=0,007$	U=458,5; $p=0,445$	-
ПТА*	10	0,6±0,2	0,2:0,4	U=419; $p=0,227$	U=133,5; $p=0,006$	U=182; $p=0,453$	U=72; $p=0,291$

Примечание: *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.

- 1- Различия между группой ТБ и группами РППТИ, Т, ПВА и ПТА,
- 2- Различия между группой РППТИ и группами ТБ, Т, ПВА и ПТА,
- 3- Различия между группой Т и группами ТБ, РППТИ, ПВА и ПТА,
- 4- Различия между группой ПВА и группами ТБ, РППТИ, Т и ПТА

Так, показатели индуцированного ИФН- γ с CFP32В (и.с.) у детей группы «ТБ» были достоверно ниже ($p=0,000$), чем в группе «РППТИ», но значимо не различались с группами «Т», «ПВА» и «ПТА» ($H=2,622$; $p=0,454$). У детей группы «РППТИ» показатель был достоверно выше, чем в группах «Т» ($p=0,000$), «ПВА» ($p=0,007$) и «ПТА» ($p=0,006$). Учитывая полученные результаты, по нашему мнению, белок CFP32В может рассматриваться в качестве антигена ранней стадии туберкулезной инфекции.

Дополнительно установили умеренную корреляцию между показателями ИФН- γ индуцированного ESAT6 и CFP32В (и.с.) (по Спирмену, $r=0,69$, $p=0,000$), Ag85a и CFP32В (по Спирмену, $r=0,58$, $p=0,000$), что также подтверждало возможность применения данного белка (CFP32В) в качестве маркера для оценки РППТИ у детей.

Установили референсные значения для CFP32В, так, показатель и.с. $\leq 1,0$ оценили как отрицательный результат (< 85 пг/мл), и.с. выше 1,0 – как положительный.

Таким образом, результаты нашего исследования впервые позволили белок CFP32В идентифицировать в качестве потенциального маркера для ЛТИ (в частности, для раннего периода первичной туберкулезной инфекции), при этом необходимо отметить возможность регистрации реакций при формировании поствакцинального противотуберкулезного иммунитета, что снижает диагностическую значимость данного белка.

6.5. Оценка уровня индуцированного ИФН- γ с Rv2660с и его значимость при развитии туберкулезной инфекции у детей

Еще одним перспективным антигеном МБТ для диагностики туберкулезной инфекции среди недавно идентифицированных белков является белок Rv2660с.

Rv2660 относятся к области RD11, закодированной в МБТ [273]. Согласно литературным данным, этот антиген больше ассоциирован с латентной стадией инфекции [159; 355], хотя его функция до конца не определена [159]. Поэтому оценка возможности распознавания иммунными клетками антигенов Rv2660с на разных стадиях туберкулезной инфекции позволит расширить представление о нем.

Оценивая уровень ИФН- γ после индукции Rv2660с (пг/мл), установили значимые различия в результатах групп сравнения: «ТБ», «ЛТИ» и «НТ» ($H=16,954$; $p=0,0007$) (таблица 6.11).

Таблица 6.11 – Уровень индуцированного ИФН- γ с Rv2660с (пг/мл) у детей исследуемых групп

Группы	n	ИФН- γ с Rv2660с (пг/мл)		Критерий Манна-Уитни (U), p^1	Критерий Манна-Уитни (U), p^2	Критерий Манна-Уитни (U), p^3
		ME	$Q_{25\%}:Q_{75\%}$			
ТБ*	109	128,2	18,7:132,0	-	$U=4674$; $p=0,001$	$U=1512,5$; $p=0,255$
ЛТИ*	114	210,8	36,0:272,0	$U=4674$; $p=0,001$	-	$U=1089$; $p=0,0005$
НТ*	32	66,2	13,0:77,5	$U=1512,5$; $p=0,255$	$U=1089$; $p=0,0005$	-

Примечание: *ТБ – группа с установленным диагнозом туберкулез; ЛТИ – группа с латентной туберкулезной инфекцией; НТ – группа не инфицированных МБТ.

- 1- Различия между группой ТБ и группами ЛТИ, НТ,
- 2- Различия между группой ЛТИ и группами ТБ, НТ,
- 3- Различия между группой НТ и группами ТБ, ЛТИ.

Так, среди детей группы «ТБ» уровень ИФН- γ после индукции Rv2660с (пг/мл) был ниже и статистически значимо отличался от показателей детей группы «ЛТИ» ($p=0,001$), не было установлено различий с «НТ» ($p=0,255$). Результаты между группами «ЛТИ» и «НТ» имели статистически значимые различия ($p=0,0005$).

При определении уровня и.с. ИФН- γ после индукции Rv2660с в группах «ТБ» ($n=109$, и.с.= $1,6\pm 0,3$; $Q_{25\%}:Q_{75\%}$ 0,3:1,7), «ЛТИ» ($n=114$, и.с.= $3,4\pm 0,5$; $Q_{25\%}:Q_{75\%}$ 0,4:3,4) и «НТ» ($n=32$, и.с.= $1,0\pm 0,2$; $Q_{25\%}:Q_{75\%}$ 0,25:1,4) также установили достоверные различия ($H=10,826$; $p=0,004$). Полученные нами данные

подтвердили предположение о том, что Rv2660с являлся белком, характеризующим ЛТИ.

Сравнивая показатели ИФН- γ после индукции Rv2660с (и.с.) у детей группы «ТБ» в зависимости от форм заболевания, установили достоверные различия ($U=724,5$; $p=0,031$), так, у детей группы «ТБ1» продукция индуцированного ИФН- γ регистрировалась на уровне $1,9 \pm 0,3$ ($n=85$, $Q_{25\%}:Q_{75\%}$ 0,4:2,0), показатель детей группы «ТБ2» был на уровне $0,8 \pm 0,2$ ($n=24$, $Q_{25\%}:Q_{75\%}$ 0,2:0,85), при этом сохранение иммунного ответа на Rv2660с могло свидетельствовать о благоприятном течении туберкулеза и возможном участии данного белка в формировании протективного иммунитета (рисунок 6.9).

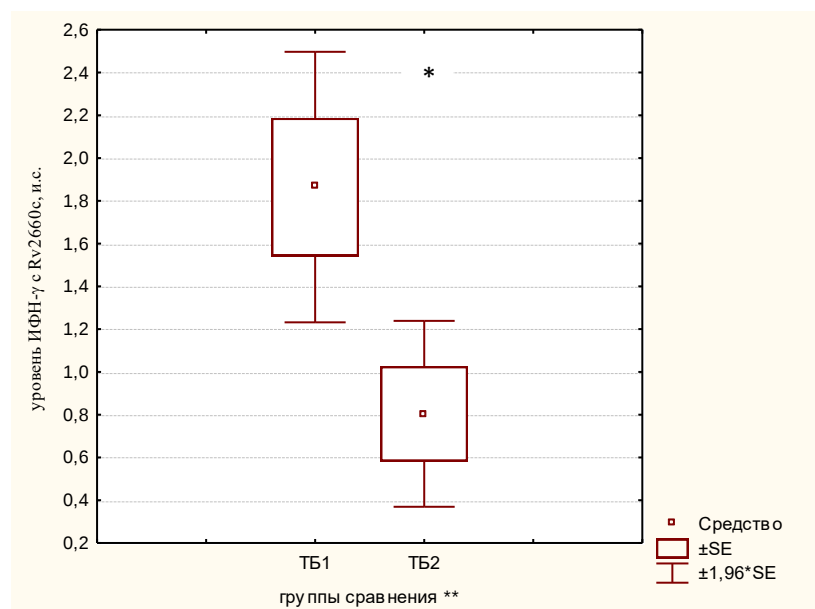


Рисунок 6.9 – Уровень индуцированного ИФН- γ с Rv2660с у детей, больных туберкулезом (и.с.)

Примечание: * $p=0,031$ (критерий Манна-Уитни)

**ТБ1 – группа детей с первичными формами туберкулеза; ТБ2 – группа детей с вторичными формами туберкулеза

Сравнивая уровень индуцированного ИФН- γ с Rv2660с у детей группы «ТБ1» в фазе инфильтрации ($n=56$, $1,9 \pm 0,4$; $Q_{25\%}:Q_{75\%}$ 0,4:2,05) и в фазе кальцинации ($n=29$, $1,75 \pm 0,4$; $Q_{25\%}:Q_{75\%}$ 0,5:1,9), в показателях различий не было установлено ($U=832,5$; $p=0,849$).

Уточняя роль белка Rv2660с на этапе латентной инфекции, оценили результаты индекса стимуляции индуцированного ИФН- γ с Rv2660с в группах сравнения, которые представлены на рисунке 6.10 (N=35,616; p=0,000).

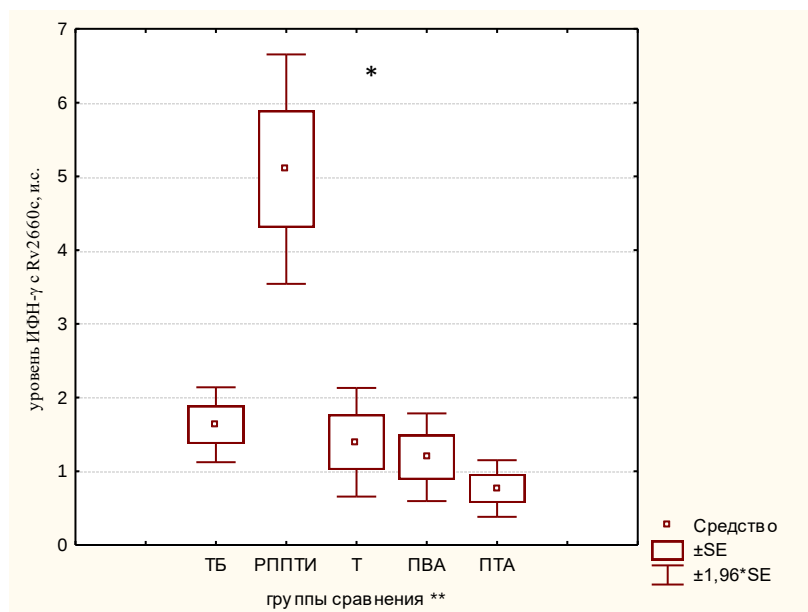


Рисунок 6.10 – Уровень индуцированного ИФН- γ с Rv2660с у детей в группах сравнения (и.с.)

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; ПАВ – группа с поствакцинальной аллергией; ПТА – группа с положительной туберкулиновой анергией.

Установленные различия также потребовали уточнения, в каких группах значим данный показатель (таблица 6.12).

Таблица 6.12 – Уровень индуцированного ИФН- γ с Rv2660с (и.с.) у детей групп сравнения

Группы	n	ИФН- γ с Rv2660с (и.с.)		Критерий Манна-Уитни (U), p ¹	Критерий Манна-Уитни (U), p ²	Критерий Манна-Уитни (U), p ³	Критерий Манна-Уитни (U), p ⁴
		ME±SEM	Q _{25%} :Q _{75%}				
ТБ*	109	1,6±0,3	0,3:1,7	-	U=4887; p=0,000	U=2724,5; p=0,558	U=1104; p=0,927
РППТИ*	61	5,1±0,8	1,1:6,9	U=4887; p=0,000	-	U=760; p=0,000	U=294; p=0,0005
Т*	53	1,4±0,4	0,3:1,2	U=2724,5; p=0,558	U=760; p=0,000	-	U=578,5; p=0,549
ПАВ*	20	1,2±0,3	0,25:1,7	U=1104; p=0,927	U=294; p=0,0005	U=578,5; p=0,549	-
ПТА*	12	0,8±0,2	0,25:1,15	U=573,5; p=0,485	U=138; p=0,0007	U=299,5; p=0,754	U=101; p=0,460

Примечание: *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.

- 1- Различия между группой ТБ и группами РППТИ, Т, ПВА и ПТА,
- 2- Различия между группой РППТИ и группами ТБ, Т, ПВА и ПТА,
- 3- Различия между группой Т и группами ТБ, РППТИ, ПВА и ПТА,
- 4- Различия между группой ПВА и группами ТБ, РППТИ, Т и ПТА

Так, показатель индуцированного ИФН- γ с Rv2660с (и.с.) у детей группы «ТБ» был достоверно ниже ($p=0,000$), чем в группе «РППТИ», при этом показатели значимо не различались с группами «Т», «ПВА» и «ПТА» ($H=0,853$; $p=0,837$). У детей группы «РППТИ» показатели были также достоверно выше, чем в группах «Т» ($p=0,000$), «ПВА» ($p=0,0005$) и «ПТА» ($p=0,0007$), что позволило рассматривать белок Rv2660с в качестве маркера ЛТИ для оценки ее ранней стадии развития, а, следовательно, это подтверждает участие данного белка в формировании адаптивного иммунитета.

Была установлена сильная корреляция между показателями индуцированного ИФН- γ с ESAT6 и с Rv2660с (и.с.) (по Спирмену, $r=0,77$, $p=0,000$), а также умеренная между показателями индуцированного ИФН- γ с Rv2660с и Ag85a (и.с.) (по Спирмену, $r=0,58$, $p=0,000$), и CFP32В (и.с.) (по Спирмену, $r=0,69$, $p=0,000$). Полученные результаты подтвердили роль белка Rv2660с в качестве антигена, связанного с ранним этапом развития туберкулезной инфекции.

По результатам исследования получили референсные значения для Rv2660с, так, показатель и.с. $\leq 2,0$ оценили как отрицательный результат (<160 пг/мл), и.с. выше 2,0 – как положительный.

Таким образом, результаты наших исследований впервые позволили белок Rv2660с рассматривать в качестве маркера ЛТИ на этапе РППТИ и его высокую значимость для дифференциальной диагностики.

6.6. Комплексная оценка специфических белков на разных этапах развития туберкулезной инфекции у детей

Комплексная оценка специфических белков позволила рассматривать вклад каждого антигена и его значимость на разных стадиях развития туберкулезной инфекции у детей. По результатам проведенного дисперсионного (кластерного) анализа по стандартизованным показателям и.с. индуцированного ИФН- γ специфическими антигенами выделили 3 кластера (рисунок 6.11).

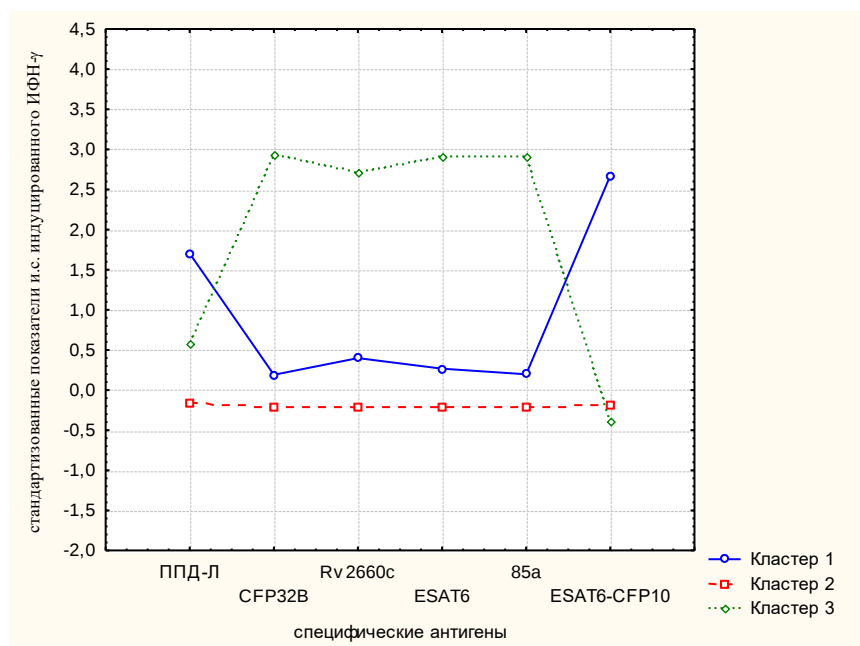


Рисунок 6.11 – Кластерный анализ по стандартизованным показателям и.с. индуцированного ИФН- γ специфическими антигенами у детей

Дисперсионный анализ показал, что все антигены вносили значимый вклад при развитии туберкулезной инфекции: ESAT6-CFP10 ($F=228,005$; $p=0,000$), CFP32B ($F=120,464$; $p=0,000$), Ag85a ($F=115,828$; $p=0,000$), ESAT6 ($F=114,893$; $p=0,000$), Rv2660c ($F=96,181$; $p=0,000$), ППД-Л ($F=45,376$; $p=0,000$). При кластеризации было выделено 3 варианта специфического иммунного ответа. Первый вариант (кластер 1) характеризовался выраженным ответом на ППД-Л и ESAT6-CFP10, а также слабовыраженным иммунным ответом на белки ранней стадии туберкулезной инфекции (CFP32B, Rv2660c, ESAT6, 85a). Второй вариант (кластер 2) характеризовался отсутствием иммунного ответа на стимуляцию

антигенами. Третий вариант (кластер 3) характеризовался выраженным ответом на CFP32B, Rv2660c, ESAT6, 85a, слабовыраженным на ППД-Л и отсутствием иммунного ответа на гибридный белок.

Среди детей из группы «ТБ» на стадии активной инфекции основной иммунный ответ регистрировали на стимуляцию ППД-Л и ESAT6-CFP10 (рисунок 6.12), что соответствовало первому варианту иммунного ответа (кластер 1, рисунок 6.11).

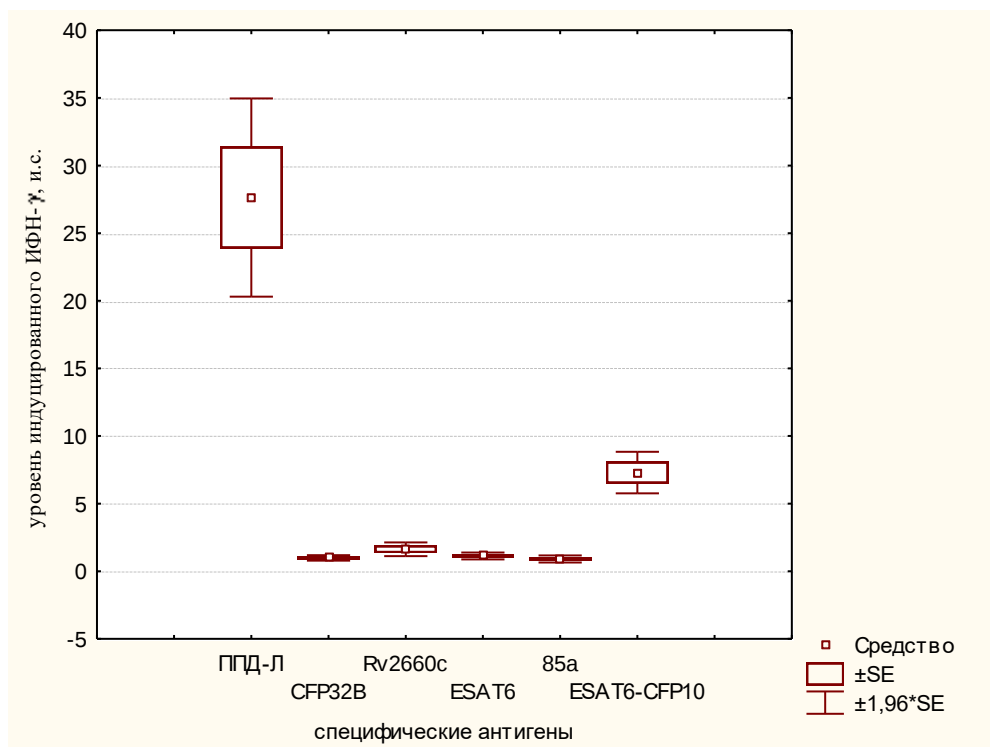


Рисунок 6.12 – Уровень индуцированного ИФН- γ специфическими антигенами у детей группы «ТБ» (и.с.)

При ранжировании показателей индуцированного ИФН- γ специфическими антигенами в группе «ТБ» установили высокосущественные различия ($p < 0,000001$). Для туберкулина и гибридного белка было установлено наибольшее значение среднего ранга R 5,945 и R 4,573. Среди белков ранней стадии туберкулезной инфекции значение среднего ранга для Rv2660c установили на уровне R 3,216; ESAT6 – R 2,624; CFP32B – R 2,413 и 85a – R 2,229.

Для уточнения возможных вариантов иммунного ответа при развитии туберкулеза у детей дополнительно провели кластерный анализ в группе «ТБ».

При проведении кластерного анализа по результатам оценки индуцированного ИФН- γ специфическими антигенами в группе «ТБ» было выделено 3 варианта иммунного ответа (рисунок 6.13).

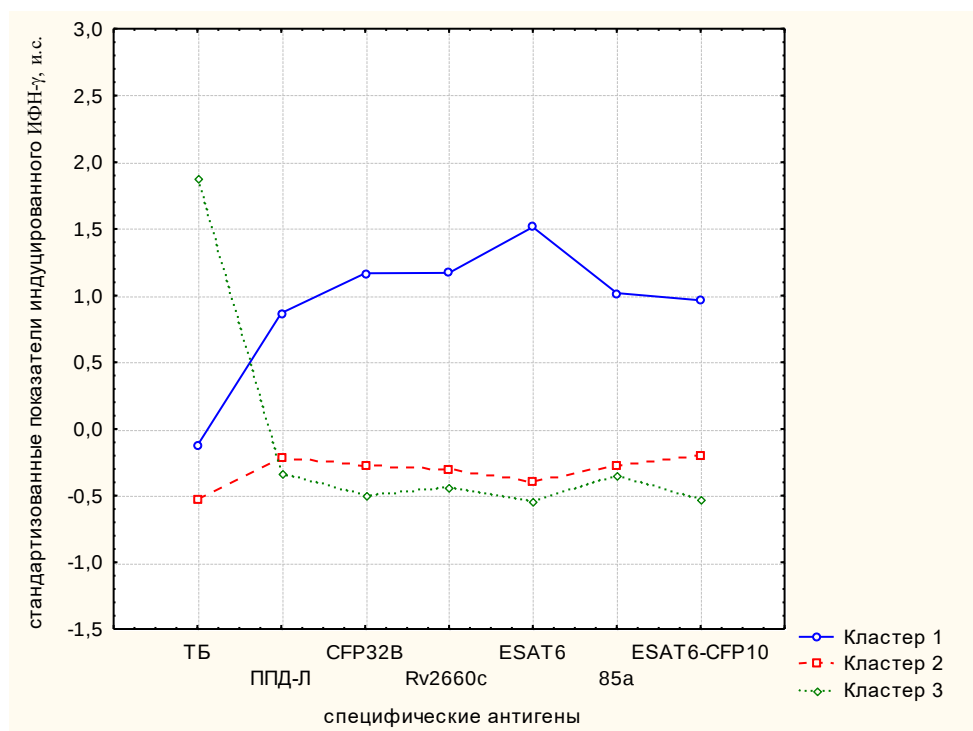


Рисунок 6.13 – Кластерный анализ по стандартизованным показателям и.с. индуцированного ИФН- γ специфическими антигенами у детей группы «ТБ»

Первые два кластера (варианта иммунного ответа) сформированы по результатам оценки индуцированного ИФН- γ специфическими антигенами у детей, больных первичными формами ТБ (ТВЛУ, ПТК), третий кластер (вариант) – при формировании вторичных форм заболевания (ИТЛ).

Среди детей с ТБ первичного генеза было выделено два варианта специфического клеточного иммунного ответа: кластер 1 с выраженным ответом, кластер 2 с низким ответом после стимуляции специфическими антигенами. Кластер 2 и 3 имели равные значения, что позволило считать низкие значения показателей при развитии ТБ риском неблагоприятного течения заболевания (коэффициент риска 1,73; 95% ДИ 1,059 – 2,828).

Среди детей из группы «ЛТИ» основное значение имели результаты при оценке ИФН- γ после стимуляции ППД-Л и белками ранней стадии туберкулезной

инфекции – CFP32B, Rv2660c, ESAT6, 85a (рисунок 6.14), – что соответствовало третьему варианту иммунного ответа (кластер 3, рисунок 6.11).

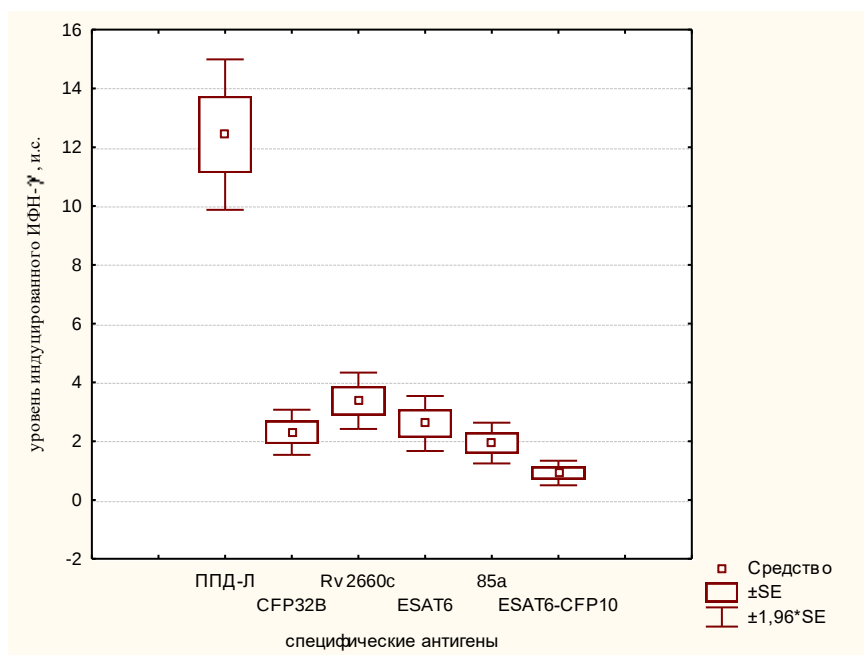


Рисунок 6.14 – Уровень индуцированного ИФН-γ специфическими антигенами у детей группы «ЛТИ» (и.с.)

При ранжировании показателей индуцированного ИФН-γ специфическими антигенами в группе «ЛТИ» установили высокосущественные различия ($p < 0,000001$). Для ППД-Л было установлено наибольшее значение среднего ранга $R = 5,667$. Среди белков ранней стадии туберкулезной инфекции значение среднего ранга для Rv2660c установили на уровне $R = 3,984$; ESAT6 – $R = 3,411$; CFP32B – $R = 3,016$, 85a – $R = 2,958$ и гибридного белка $R = 1,964$.

Для уточнения возможных вариантов иммунного ответа при развитии ЛТИ дополнительно провели кластерный анализ. При проведении кластерного анализа по результатам оценки индуцированного ИФН-γ специфическими антигенами в группе «ЛТИ» было выделено сначала 2 варианта-кластера (с учетом групп ЛТИ – РППТИ и Т) (рисунок 6.15), затем 3 варианта иммунного ответа-кластера (рисунок 6.16).

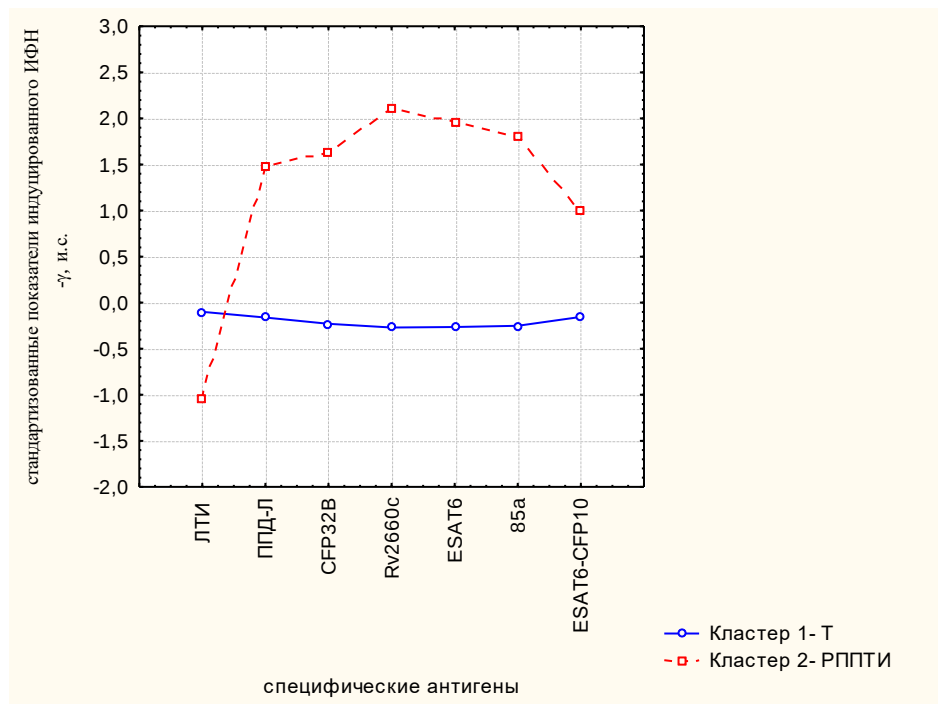


Рисунок 6.15 – Кластерный анализ по стандартизованным показателям и.с. индуцированного ИФН- γ специфическими антигенами у детей группы «ЛТИ» с выделением двух кластеров

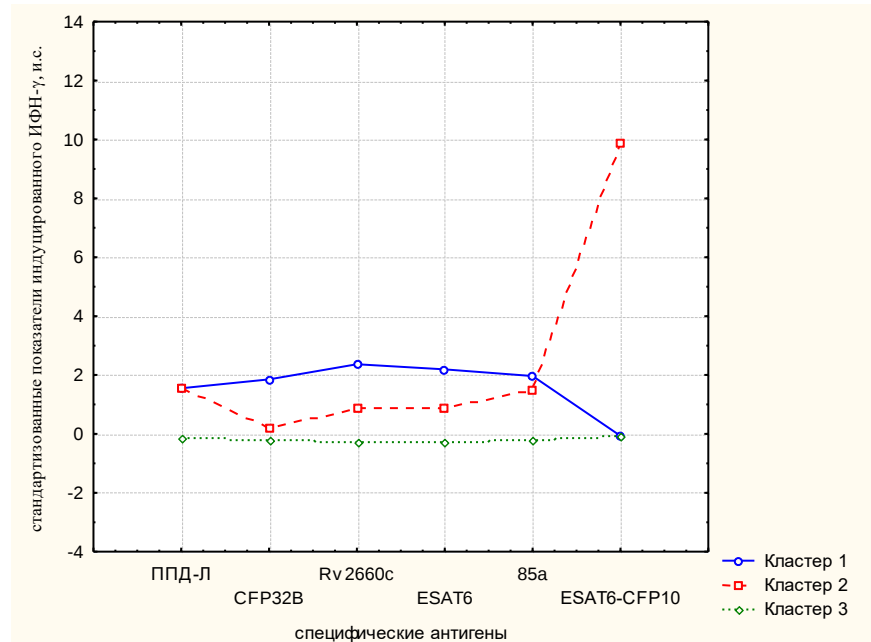


Рисунок 6.16 – Кластерный анализ по стандартизованным показателям и.с. индуцированного ИФН- γ специфическими антигенами у детей группы «ЛТИ» с выделением трех кластеров

Первые два кластера (рисунок 6.16) сформированы по результатам оценки индуцированного ИФН- γ специфическими антигенами у детей в РППТИ, третий кластер – при инфицировании МБТ более года.

Среди детей в РППТИ было выделено два варианта специфического клеточного иммунного ответа: кластер 1 с выраженным ответом на белки ранней стадии туберкулезной инфекции и отсутствием ответа при стимуляции гибридным белком, кластер 2 – снижение выраженности ответа на белки ранней стадии туберкулезной инфекции и выраженный ответ на ESAT6-CFP10, при равных значениях на туберкулин. Значения кластера 2 соответствовало кластеру 1 (рисунок 6.13), что позволило данный вариант иммунного ответа у детей с ЛТИ рассматривать в качестве высокого риска развития ТБ (коэффициент риска 4,047; 95% ДИ 2,797 – 5,856). Значения кластера 3 (отсутствие иммунного ответа у ранее инфицированных МБТ) позволили говорить о дормантном состоянии МБТ у ранее инфицированных.

Таким образом, при ЛТИ значимыми являлись показатели оценки иммунного ответа на белки ранней стадии ее развития в РППТИ, а регистрация выраженного иммунного ответа на гибридный белок среди данной категории пациентов позволяла выделить группу высокого риска по ТБ.

Среди детей группы «НТ» результаты не имели значимого ответа (рисунок 6.17).

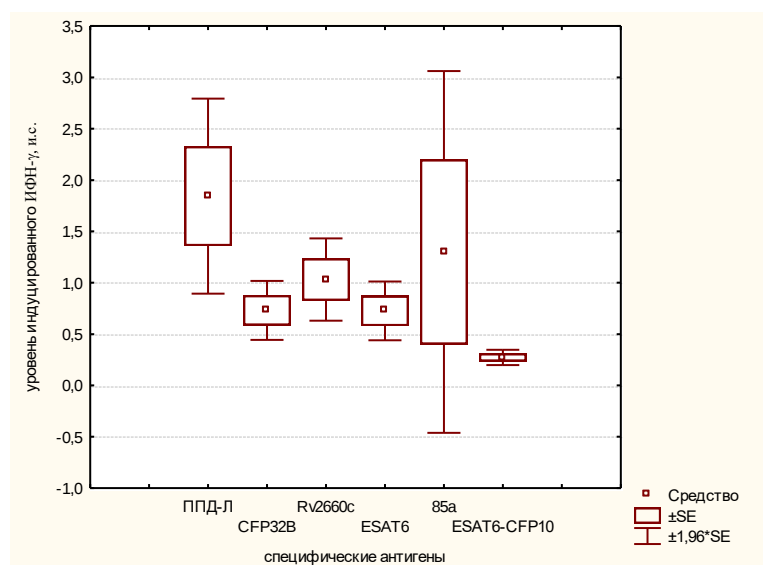


Рисунок 6.17 – Уровень продукции индуцированного ИФН- γ специфическими антигенами у детей группы «НТ» (и.с.)

При проведении кластерного анализа по результатам оценки индуцированного ИФН- γ специфическими антигенами в группе «НТ» было выделено 3 варианта иммунного ответа (рисунок 6.18).

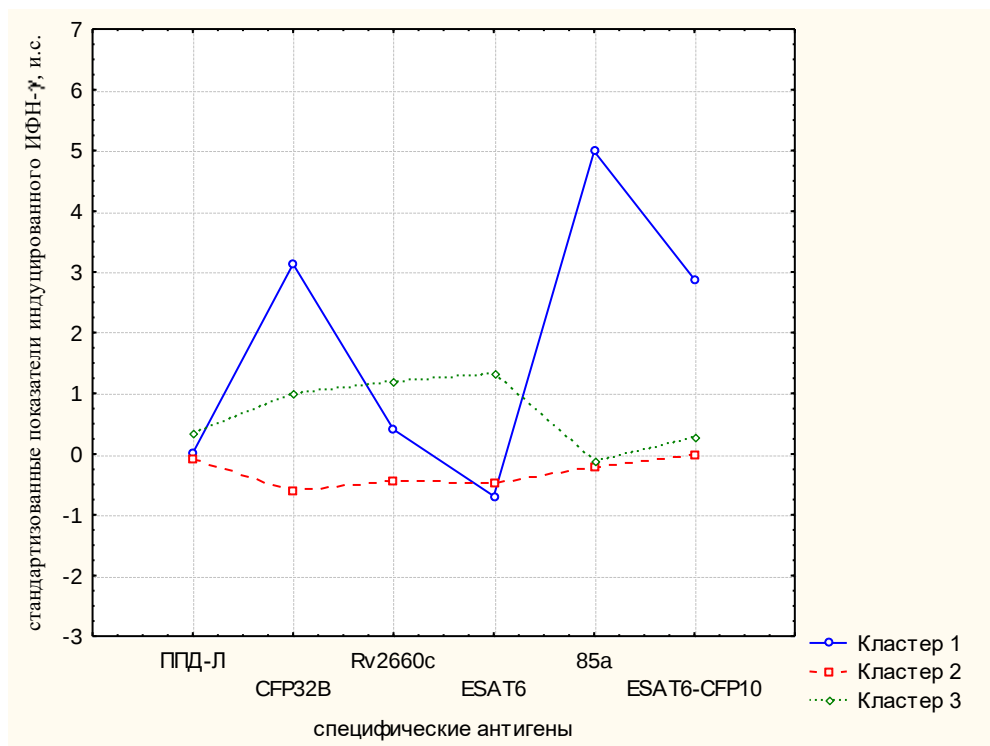


Рисунок 6.18 – Кластерный анализ по стандартизованным показателям и.с. индуцированного ИФН- γ специфическими антигенами у детей группы «НТ»

Так как среди детей группы «НТ» были пациенты с ПВА (дети раннего возраста) и не инфицированные МБТ по результатам туберкулинодиагностики (с ПТА), кластеризация позволила уточнить возможные варианты иммунного ответа при стимуляции специфическими антигенами. При кластеризации стандартизованных показателей и.с. установили, что для детей, входящих в подгруппу «ПВА», было характерно два варианта специфического клеточного ответа по кластеру 1 и кластеру 3. Кластер 1 характеризовался выраженным ответом на два белка ранней стадии туберкулезной инфекции – CFP32B и 85a – и отсутствием ответа на ESAT6, Rv2660c, что позволило говорить об истинной поствакцинальной аллергии. Кластер 3 характеризовался ответом на три белка ранней стадии туберкулезной инфекции: ESAT6, Rv2660c, CFP32B. Учитывая,

что гены белков ESAT6 и Rv2660с не входят в геном БЦЖ, это позволило рассматривать как вариант обусловленный инфекционной аллергией (ЛТИ), что нельзя исключить, т.к. диагноз ПВА у детей раннего возраста устанавливали по результатам туберкулинодиагностики и исключения ТБ. Кластер 2 характеризовался отсутствием ответа на все специфические антигены, что позволяло говорить об истинной ситуации отсутствия туберкулезной инфекции у детей (ранее не инфицированных МБТ). По результатам дисперсионного анализа значимый вклад в оценку ПВА внесли антигены 85а ($F=2677,008$; $p=0,000$) и CFP32В ($F=82,101$; $p=0,000$). Антигены ESAT6 ($F=20,099$; $p=0,00001$), Rv2660с ($F=10,214$; $p=0,0007$), ESAT6-CFP10 ($F=2,889$; $p=0,077$) и ППД-Л ($F=0,740$; $p=0,489$) при решении вопроса о ПВА менее значимы.

6.7. Иммунодиагностика туберкулезной инфекции у детей в тестах *in vitro*

Исследования последних лет показывают, что клиническое разнообразие при развитии туберкулезной инфекции может рассматриваться как непрерывный спектр, простирающийся от стерилизации иммунитета, субклинического течения заболевания до скоротечного активного процесса с традиционными обозначениями латентной инфекции и активной формы болезни [254; 291; 440]. Основным недостатком настоящего времени является отсутствие золотого стандарта диагностики туберкулезной инфекции, т.к. ни один из них не обладает достаточной чувствительностью или специфичностью для определения «места на спектре» данной инфекции [254]. Обобщенный анализ исследований последних лет (TBNET) также свидетельствует об ограниченности современных тестов, используемых у взрослых и детей для ранней диагностики туберкулезной инфекции [311].

С целью оптимизации диагностических методов проведена оценка информативности показателей специфических иммунологических тестов, характеризующих клеточный противотуберкулезный иммунитет. Оценка

информативности тестов проведена после обследования детей и уточнения значимости специфических антигенов.

6.7.1. Оценка информативности специфического иммунологического исследования *in vitro*: определение уровня индуцированного ИФН- γ с ППД-Л и ESAT6-CFP10 при развитии туберкулезной инфекции у детей

По результатам проведенного исследования (см. п. 6.1), при оценке ППД-Л в качестве маркера туберкулезной инфекции установили, что митоген оказался значимым для диагностики инфекции, это подтвердила и умеренная корреляция (по Спирмену, $r=0,57$, $p=0,000$) между показателями индуцированного ИФН- γ с ППД-Л (и.с.) и пробой Манту с 2 ТЕ ППД-Л (мм). При этом наличие реакций на ППД-Л у вакцинированных затрудняет возможности применения его для дифференциальной диагностики [254]. Поэтому с целью оптимизации теста *in vitro* для диагностики туберкулезной инфекции у вакцинированных детей провели определение диагностических критериев показателя ИФН- γ , индуцированного ППД-Л (таблица 6.13).

Таблица 6.13 – Показатели диагностического уровня индуцированного ИФН- γ ППД-Л у детей в группах сравнения (и.с.)

группы сравнения*	ИФН- γ с ППД-Л, и.с.	Критерий Манна-Уитни (U), p^1	Критерий Манна-Уитни (U), p^2	Критерий Манна-Уитни (U), p^3	Критерий Манна-Уитни (U), p^4
	МЕ ($Q_{25\%}$: $Q_{75\%}$)				
ТБ, n=100	26,8 (18,9:34,7)	-	U=2346,5 $p=0,021$	U=476 $p=0,000$	U=47,5 $p=0,000$
РППТИ, n=60	18,1 (12,4:23,8)	U=2346,5 $p=0,021$	-	U=434,5 $p=0,000$	U=39 $p=0,00001$
Т, n=35	5,7 (4,0:7,4)	U=476 $p=0,000$	U=434,5 $p=0,000$	-	U=95,5 $p=0,030$
ПВА, n=10	2,1 (1,2:3,0)	U=47,5 $p=0,000$	U=39 $p=0,00001$	U=95,5 $p=0,030$	-
ПТА, n=12	0,5 (0,3:0,6)	U=8 $p=0,000$	U=13,5 $p=0,000$	U=3,5 $p=0,000$	U=109 $p=0,001$

Примечание: *ТБ – группа с установленным диагнозом туберкулез; РППТИ – группа детей в раннем периоде первичной туберкулезной инфекции; Т – группа ранее инфицированных МБТ;

ПВА – группа с поствакцинальной аллергией; ПТА – группа с положительной туберкулиновой анергией.

r^1 – Различия между группой ТБ и группами РППТИ, Т, ПВА и ПТА,

r^2 – Различия между группой РППТИ и группами ТБ, Т, ПВА и ПТА,

r^3 – Различия между группой Т и группами ТБ, РППТИ, ПВА и ПТА,

r^4 – Различия между группой ПВА и группами ТБ, РППТИ, Т и ПТА.

Оценивая результаты продукции ИФН- γ с ППД-Л по индексу стимуляции, было установлено, что уровень выше 4,0 значим для диагностики ЛТИ (выше 200 пг/мл). При показателе и.с. выше 7,0 необходимо исключать ранний период первичной туберкулезной инфекции, а выше 19,0 – активный туберкулезный процесс.

Полученные результаты позволили вычислить «специфичность» и «чувствительность» теста по определению уровня индуцированного ИФН- γ с ППД-Л. Для диагностики ЛТИ, в отличие от пробы Манту с 2 ТЕ ППД-Л [338; 254], тест имел более высокую специфичность, равную 95,45% (95% ДИ от 78,2 до 99,19%), при чувствительности 90% (95% ДИ от 79,85 до 95,34%). Диагностическая точность теста составила 91,46% (95% ДИ от 83,41 до 95,8%). При этом необходимо отметить, что показатель менее 4,0 и.с. при ЛТИ может быть обусловлен дормантным состоянием МБТ у ранее инфицированных или ПВА, что снижает диагностическую значимость теста и требует включения дополнительных антигенов для расширения возможности дифференциальной диагностики туберкулезной инфекции у детей.

Для диагностики ТБ прогностическая ценность положительного результата теста была установлена на уровне 88,46% (95% ДИ от 80,91 до 93,28%) и отрицательного результата на уровне 89,74% (95% ДИ от 81,05 до 94,71%) («специфичность» – 85,37%; 95% ДИ от 76,14 до 91,43%; «чувствительность» – 92%; 95% ДИ от 85 до 95,89%). Учитывая снижение специфичности теста при диагностике туберкулеза, возможен риск пропуска патологии.

Таким образом, иммунологический тест *in vitro* по определению уровня индуцированного ИФН- γ с ППД-Л, имея более высокую чувствительность и

специфичность в диагностике ЛТИ у детей, может быть рекомендован в качестве скрининга на этапе выявления туберкулезной инфекции.

Результаты исследования (см. гл. 6.2) оценки значимости гибридного белка для выявления активной туберкулезной инфекции позволили выявить умеренную корреляцию (по Спирмену, $r=0,72$, $p=0,000$) между показателями индуцированного ИФН- γ с ESAT6-CFP10 (и.с.) и результатами пробы с АТР (мм). В настоящее время существующие тесты IGRA (квантифероновый и T-SPOT), использующие в качестве индуктора белки ESAT6 и CFP10, предлагаются для диагностики ЛТИ и оценки высокого риска развития ТБ, реализующегося в течение последующих двух лет [254; 468]. С целью оценки информативности теста *in vitro* для дифференцированной диагностики латентной и активной туберкулезной инфекции провели определение диагностических критериев показателя индуцированного ИФН- γ с ESAT6-CFP10 (таблица 6.14).

Таблица 6.14 – Показатели диагностического уровня индуцированного ИФН- γ с ESAT6-CFP10 у детей в группах сравнения (и.с.)

группы сравнения*	ИФН- γ с ESAT6-CFP10, и.с.	Критерий Манна-Уитни (U), p^1	Критерий Манна-Уитни (U), p^2	Критерий Манна-Уитни (U), p^3	Критерий Манна-Уитни (U), p^4
	МЕ (Q _{25%} :Q _{75%})				
ТБ, n=100	7,7 (6:9,3)	-	U=784,5 $p=0,000$	U=155,5 $p=0,000$	U=63 $p=0,000$
РППТИ, n=60	1,3 (0,4:2,3)	U=784,5 $p=0,000$	-	U=630,5 $p=0,001$	U=224 $p=0,201$
Т, n=35	0,2 (0,1:0,3)	U=155,5 $p=0,000$	U=630,5 $p=0,001$	-	U=191 $p=0,662$
ПВА, n=10	0,3 (0,1:0,6)	U=63 $p=0,000$	U=224 $p=0,201$	U=191 $p=0,662$	-
ПТА, n=12	0,2 (0,2:0,3)	U=60 $p=0,000$	U=306 $p=0,415$	U=294 $p=0,04$	U=54 $p=0,692$

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

p^1 – Различия между группой ТБ и группами РППТИ, Т, ПВА и ПТА,

p^2 – Различия между группой РППТИ и группами ТБ, Т, ПВА и ПТА,

p^3 – Различия между группой Т и группами ТБ, РППТИ, ПВА и ПТА,

p^4 – Различия между группой ПВА и группами ТБ, РППТИ, Т и ПТА.

Оценивая результаты индуцированного ИФН- γ с ESAT6-CFP10 по и.с., было установлено, что уровень до 2,0 может быть диагностически значим для ЛТИ, так, положительные реакции регистрировали у 9 пациентов (15%), что свидетельствовало об активной инфекции и высоком риске формирования ТБ у детей с ЛТИ.

Полученные результаты исследования по определению уровня индуцированного ИФН- γ с ESAT6-CFP10 позволили нам вычислить «специфичность» и «чувствительность» теста. Для диагностики ЛТИ тест имел высокую специфичность, равную 100% (95% ДИ от 85,13 до 100%), но низкую чувствительность – 25% (95% ДИ от 15,78 до 37,23%). Диагностическая точность теста составила 45,12% (95% ДИ от 34,81 до 55,87%). За счет большого количества ложноотрицательных реакций диагностическая значимость теста для ЛТИ очень низкая. Также тест малоинформативен для дифференциальной диагностики ЛТИ и ПВА ($p_{\text{РППТИ}}=0,201$; $p_{\text{T}}=0,662$). При этом для определения ТБ прогностическая ценность положительного результата теста была установлена на уровне 94,05% (95% ДИ от 86,81 до 97,43%) и отрицательного результата на уровне 78,57% (95% ДИ от 69,45 до 85,54%) («специфичность» – 93,9%; 95% ДИ от 86,51 до 97,37%; «чувствительность» – 79%; 95% ДИ от 70,02 до 85,83%), диагностическая точность составила 85,71% (95% ДИ от 79,89 до 90,06%). Учитывая более высокую информативность для диагностики ТБ, данный тест может быть рекомендован на этапе диагностики заболевания.

С целью повышения информативности теста *in vitro* по определению уровня ИФН- γ после индукции ППД-Л и ESAT6-CFP10 провели комплексную оценку. Для диагностики ТБ специфичность теста составила 93,9% (95% ДИ 86,51-97,37%), а чувствительность – 92% (95% ДИ 85-95,89%). Полученные результаты свидетельствовали о более высокой информативности для диагностики ТБ по сравнению с оценкой теста только по одному антигену. Для диагностики ЛТИ специфичность теста установлена на уровне 100% (95% ДИ 85,13-100%), чувствительность – 90% (95% ДИ 79,85-95,34%), что также свидетельствовало о более высокой его информативности.

Таким образом, результаты информативности тестов *in vitro* по определению уровня ИФН- γ после индукции ППД-Л и ESAT6-CFP10 высокоинформативны, а их комплексная оценка повышала специфичность теста для диагностики ТБ и ЛТИ, тем не менее остаются открытыми вопросы дифференциальной диагностики ЛТИ и ПБА.

6.7.2. Оценка информативности специфического иммунологического исследования *in vitro*: определение уровня индуцированного ИФН- γ с ESAT6 и Rv2660с при развитии туберкулезной инфекции у детей

Современная тест-система T-SPOT включает два специфических белка, один из них ESAT6 [208], при этом отсутствует дифференцированная оценка полученных результатов [468], что снижает значимость теста при диагностике ЛТИ [208; 468]. Наши результаты (см. п. 6.3) позволили говорить о значимости белка ESAT6 в качестве маркера ЛТИ, но не ТБ, что подтверждалось слабой корреляцией между показателями индуцированного ИФН- γ с ESAT6 и ESAT6-CFP10 (и.с.) (по Спирмену, $r=0,1$, $p=0,041$).

По результатам определения уровня индуцированного ИФН- γ с ESAT6 вычислили «специфичность» и «чувствительность» теста. Для диагностики ТБ тест имел невысокую специфичность, равную 64,63% (95% ДИ от 53,84 до 74,11%), и низкую чувствительность – 23% (95% ДИ от 15,84 до 32,15%). Для диагностики ЛТИ (РППТИ) тест имел более высокую специфичность, равную 100% (95% ДИ от 85,13 до 100%), и невысокую чувствительность – 48,33% (95% ДИ от 36,17 до 60,69%), что снижало информативность данного исследования для диагностики ЛТИ.

Данные по диагностической информативности специфического белка Rv2660с отсутствуют. По результатам наших исследований была установлена значимость данного белка для диагностики ЛТИ (см. п. 6.5). Полученные результаты позволили вычислить «специфичность» и «чувствительность» теста по определению уровня индуцированного ИФН- γ с Rv2660с. Для диагностики ТБ

тест имел как невысокую специфичность, равную 52,44% (95% ДИ от 41,76 до 62,9%), так и чувствительность – 23% (95% ДИ от 15,84 до 32,15%). Для диагностики ЛТИ (РППТИ) тест имел более высокую специфичность, равную 100% (95% ДИ от 85,13 до 100%), и более высокую чувствительность – 65% (95% ДИ от 52,36 до 75,83%). Диагностическая точность теста составила 74,39% (95% ДИ от 64 до 82,6%), что повышало информативность данного исследования для диагностики ЛТИ.

Учитывая, что к выбранным белкам (ESAT6 и Rv2660с) отсутствуют гены в геноме штамма БЦЖ [273; 480], и они, по нашему мнению, являлись значимыми для диагностики ЛТИ (РППТИ), провели комплексную оценку их информативности. Так, специфичность установлена на уровне 100% (95% ДИ от 85,13 до 100%) и чувствительность – 68,33% (95% ДИ от 55,77 до 78,69%), что повышало информативность теста для диагностики ЛТИ, в первую очередь ее раннего периода, и исключало ПВА.

Таким образом, оценивая информативность тестов для диагностики ЛТИ (РППТИ) по определению индуцированного ИФН- γ с ESAT6 и Rv2660с, была установлена их высокая специфичность, что позволяет учитывать данные результаты при дифференциальной диагностике туберкулезной инфекции у детей.

6.7.3. Оценка информативности специфического иммунологического исследования *in vitro*: определение уровня индуцированного ИФН- γ с CFP32В и Ag85а при развитии туберкулезной инфекции у детей

Учитывая, что гены белков CFP32В и 85а расположены как в геноме БЦЖ, так и H37Rv [222; 387], мы предполагали, что это снижает диагностическое значение теста по определению индуцированного ИФН- γ с CFP32В и Ag85а для ЛТИ. Тем не менее нами были получены результаты (см. п. 6.3 и 6.4), свидетельствующие о значимости выбранных белков при оценке ЛТИ.

При оценке индукции Ag85а была установлена умеренная корреляция между показателями индуцированного ИФН- γ с ESAT6 и Ag85а (и.с.) (по

Спирмену, $r=0,59$, $p=0,000$), что подтверждало значимость Ag85a в качестве антигена ранней стадии туберкулезной инфекции.

Полученные результаты позволили вычислить «специфичность» и «чувствительность» теста по определению уровня индуцированного ИФН- γ Ag85a. Для диагностики ТБ тест имел невысокую специфичность, равную 54,88% (95% ДИ от 44,13 до 65,19%), и низкую чувствительность – 33% (95% ДИ от 24,56 до 42,69%). Для диагностики ЛТИ тест имел более высокую специфичность, равную 95,45% (95% ДИ от 78,2 до 99,19%), и невысокую чувствительность – 60% (95% ДИ от 47,37 до 71,43%), что повышало информативность данного теста для диагностики ЛТИ (РППТИ).

Полученные результаты позволили также вычислить «специфичность» и «чувствительность» теста по определению уровня индуцированного ИФН- γ с CFP32B. Для диагностики ТБ тест имел невысокую специфичность, равную 42,68% (95% ДИ от 32,54 до 53,48%), и чувствительность 36% (95% ДИ от 27,27 до 45,76%), что согласуется с результатами С. Benabdeselem с соавт. (2006) [222]. Для диагностики ЛТИ тест имел более высокую специфичность, равную 81,82% (95% ДИ от 61,48 до 92,69%), и более высокую чувствительность – 71,67% (95% ДИ от 59,23 до 81,49%). Диагностическая точность теста составила 74,39% (95% ДИ от 64 до 82,6%), что повышало информативность данного исследования для диагностики ЛТИ (РППТИ).

Таким образом, для диагностики ЛТИ также информативными оказались тесты по определению индуцированного ИФН- γ с CFP32B и Ag85a.

6.7.4. Комплексная оценка информативности специфического иммунологического исследования *in vitro*: определение уровня индуцированного ИФН- γ специфическими антигенами при развитии туберкулезной инфекции у детей

При комплексной оценке теста определения уровня индуцированного ИФН- γ специфическими антигенами ESAT6, Rv2660c, 85a и CFP32B (и.с.) для

диагностики РППТИ установили специфичность на уровне 100% (95% ДИ от 85,13 до 100%) и чувствительность 93,33% (95% ДИ от 84,07 до 97,38%).

Оценивая информативность теста для РППТИ, при индукции ППД-Л, ESAT6-CFP10, ESAT6, Ag85a, Rv2660c и CFP32B, установили более высокую чувствительность теста. Так, чувствительность составила 98,33% (95% ДИ 91,14-99,71%), а специфичность – 100% (95% ДИ 85,13-100%), диагностическая точность теста была на уровне 98,78% (95% ДИ 93,41-99,78%).

Учитывая высокую информативность теста по определению индуцированного ИФН- γ специфическими антигенами для диагностики туберкулезной инфекции установили, что для детей, у которых по результатам туберкулинодиагностики регистрировали инфицирование МБТ (125 детей), 5 вариантов иммунного ответа на антигены: первый составили дети с отрицательными результатами тестов (расценили как вариант не инфицированных МБТ) – 3 человека (2,4%), 2-й вариант – с положительными результатами на ППД-Л (ниже 4,0 и.с.), CFP32B, Ag85a и отрицательными на ESAT6, Rv2660c и ESAT6-CFP10 (расценили как вариант ПБА) – 11 человек (8,8%), 3-й составили результаты положительных реакций на ППД-Л, ESAT6, Rv2660c у 39 детей (31,2%) (расценили как вариант РППТИ), 4-й составили результаты только положительных реакций на ППД-Л (выше 4,0 и.с.) и отрицательных при стимуляции остальными белками (расценили как вариант раннего инфицирования МБТ – дормантное состояние инфекции) – 47 (37,7%), 5-й составили результаты положительных реакций на гибридный белок – 25 (20%) (расценено как активная туберкулезная инфекция – группа высокого риска ТБ).

Таким образом, полученные результаты могут свидетельствовать о гипердиагностике ЛТИ при стандартном обследовании (туберкулинодиагностика) ребенка в 11,2% случаев (14) и недооценке результатов в 20% случаев (при высоком риске ТБ), и только в 68,9% (86) результаты соответствовали ЛТИ без признаков ее активности. При этом среди пациентов с ЛТИ (111) в 42,3% случаев (47) инфекция находилась в дормантном состоянии, что исключало необходимость диспансерного наблюдения, поэтому только в 57,7% случаев (64)

результаты свидетельствовали о необходимости наблюдения и только в 22,5% случаев (25) – проведения превентивной противотуберкулезной терапии при исключении ТБ.

Резюме:

Таким образом, оценивая значимость специфических белков ППД-Л, ESAT6-CFP10, ESAT6, 85a, Rv2660c и CFP32B на разных стадиях развития туберкулезной инфекции у детей, установили, что белки ESAT6, 85a, Rv2660c и CFP32B можно рассматривать в качестве маркеров латентной инфекции на ее ранней стадии развития. Результаты оценки гибридного белка ESAT6-CFP10 позволили нам рассматривать его в качестве маркера активной туберкулезной инфекции, преимущественно на стадии развития заболевания или высокого риска ТБ. Также установили, что может быть значимо применение ППД-Л в качестве митогена для общей оценки уровня выраженности специфического иммунитета, при этом возможны трудности в правильной интерпретации полученных результатов, учитывая высокую частоту встречаемости положительных результатов у лиц с ПБА. Среди недавно идентифицированных антигенов более значимым для ЛТИ оказался Rv2660c, а антиген CFP32B был менее значим за счет перекрестной реактивности между БЦЖ и МБТ, так же как на ППД-Л и Ag85a. В связи с чем перспективными для оценки латентной инфекции являются 2 антигена: ESAT6 и Rv2660c, для активной – ESAT6-CFP10, что позволяет их рекомендовать для использования в специфических тестах для диагностики туберкулезной инфекции.

Определены значимые диагностические критерии по уровню индуцированного ИФН- γ специфическими антигенами (ППД-Л, ESAT6-CFP10, ESAT6, Rv2660c, 85a и CFP32B) для диагностики ТБ, ЛТИ и ПБА. Для ПБА характерны показатели уровня индуцированного ИФН- γ с ППД-Л до 4,0 (и.с.), положительный результат мог сочетаться с ответом на стимуляцию CFP32B и/или Ag85a. Сочетание положительной реакции на ППД-Л с положительными результатами на белки ранней стадии туберкулезной инфекции – ESAT6 и Rv2660c – исключало ПБА. Для ЛТИ диагностический уровень индуцированного

ИФН- γ с ППД-Л 4,0 и более и.с., который мог сочетаться с ответом на белки ранней стадии туберкулезной инфекции (и/или: ESAT6, Rv2660c, Ag85a, CFP32B), диагностировали РППТИ, при отсутствии ответа на белки ранней стадии туберкулезной инфекции – ранее инфицирование МБТ. Для определения активной туберкулезной инфекции значимыми являлись уровень индуцированного ИФН- γ с ППД-Л более 19,0 (и.с.) и положительная реакция на ESAT6-CFP10.

Оценивая информативность тестов *in vitro* по определению уровня индуцированного ИФН- γ специфическими антигенами (ППД-Л, ESAT6-CFP10, ESAT6, Rv2660c, 85a и CFP32B) для диагностики туберкулезной инфекции, установили их высокую информативность при комплексной оценке на уровне 98,78%.

Примером использования теста по определению индуцированного ИФН- γ специфическими антигенами явился следующий клинический случай:

Алина П., 14.07.08 г., направлена на консультацию в КПТД (при оформлении в школу) с диагнозом: Тубинфицирование? По результатам туберкулинодиагностики с 2009 г. отмечаются положительные результаты, в КПТД не наблюдалась. Из анамнеза жизни известно, что ребенок организованный, из социально-сохранной семьи, в течение года регистрировали до 4 эпизодов острых респираторных заболеваний, имеет отягощенный аллергоанамнез. Контакт с больным туберкулезом не был установлен. По результатам вакцинации против туберкулеза (2008 г.) регистрировали формирование рубца 6 мм, проба Манту с 2 ТЕ ППД-Л через год после вакцинации – инфильтрат 8 мм, что свидетельствовало о результативности вакцинации. С целью уточнения активности туберкулезной инфекции и решения вопроса о необходимости наблюдения в КПТД провели специфическое иммунологическое исследование (2015 – проба Манту с 2 ТЕ ППД-Л, инфильтрат 8 мм, проба с АТР – результат отрицательный), дополнительно провели тест *in vitro* (учитывая отягощенный аллергоанамнез) по определению уровня индуцированного ИФН- γ после стимуляции специфическими антигенами

(27.07.2015): зарегистрировали положительную реакцию на ППД-Л и отрицательные на Ag85a, CFP32B, Rv2660c, ESAT6, ESAT6-CFP10, что подтвердило отсутствие активной туберкулезной инфекции. В заключении диагноз: Инфицирование МБТ, ребенок учету в КПТД не подлежал.

Полученные результаты позволяют рекомендовать тесты *in vitro* по определению индуцированного ИФН- γ специфическими антигенами (ППД-Л, ESAT6-CFP10, ESAT6, Rv2660c, 85a и CFP32B) для диагностики латентной и активной туберкулезной инфекции, а также для дифференциальной диагностики ПБА и разных стадий ЛТИ.

ГЛАВА 7. АЛГОРИТМ ПЕРСОНИФИЦИРОВАННОЙ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ: РАЗРАБОТКА И ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ

На основании проведенных исследований с оценкой медико-социальных, клинико-анамнестических данных, в том числе результатов специфического иммунологического, молекулярно-генетического исследования и определения факторов риска, иммунологических и генетических маркеров туберкулезной инфекции среди детей групп ТБ, ЛТИ, НТ, было разработано 3 модуля (для двух диагностических компьютерных программ) для оценки вероятности развития туберкулезной инфекции с использованием теоремы Байеса и возможностей программы Microsoft Excel. Для разработки модулей было сформировано 4 группы: группа ТБ0 – 30 детей с установленным ТБ, группа ЛТИ1 – 30 детей с установленным виражом туберкулиновых проб (в РППТИ); группа ЛТИ2 – 30 детей, инфицированных МБТ более 1 года, группа НТ0 – 30 детей, не инфицированных МБТ. Разработанные модули были реализованы в компьютерных программах, позволяющих упростить расчет риска. Программа № 1 («Выявление туберкулезной инфекции у детей») – для выявления риска ЛТИ у детей на педиатрическом этапе. Программа № 2 («Ранняя диагностика туберкулезной инфекции у детей») – для выявления группы высокого риска по ТБ среди детей с ЛТИ на фтизиатрическом этапе. Разработанные модули для диагностических компьютерных программ стали основой «Алгоритма персонафицированной диагностики туберкулезной инфекции у детей».

7.1. Оценка диагностической эффективности модуля программы № 1 «Выявление туберкулезной инфекции у детей»

Используя частоты, приведенные в таблице 7.1, вычислили вероятность наличия риска ЛТИ у детей (частоты были рассчитаны для групп НТ0 и ЛТИ1). Дополнительно для оценки ЛТИ определили уровень ИФН- γ после стимуляции

туберкулином (ППД-Л) в тесте *in vitro*. Расчет на основе приведенных данных в таблице 7.1 был взят за основу модуля программы № 1 (приложение А) для педиатрического этапа выявления риска ЛТИ (1 – обозначал наличие признака, 0 – его отсутствие). Заметим, что если симптом отсутствовал, то при вычислении вероятности вместо $P(S|D)$ использовалась величина $[1 - P(S|D)]$ (1).

$$P(D_1|S_j) = \frac{P(D_1) [1-P(S_1|D_1)] P(S_3|D_1) [1-P(S_4|D_1)] [1-P(S_5|D_1)] \times \\ \times [1-P(S_6|D_1)] [1-P(S_7|D_1)] P(S_8|D_1) P(S_9|D_1)] \times \\ \times [1-P(S_{10}|D_1)] P(S_{11}|D_1)}{\text{Числитель} + P(D_2) [1-P(S_1|D_2)] P(S_3|D_2) [1-P(S_4|D_2)] \times \\ \times [1-P(S_5|D_2)] [1-P(S_6|D_2)] [1-P(S_7|D_2)] P(S_8|D_2) P(S_9|D_2)] \times \\ \times [1-P(S_{10}|D_2)] P(S_{11}|D_2)}, \quad (1)$$

Для упрощения понимания расчетов на примере взяты первые 11 признаков, встречающихся у детей с ЛТИ.

Таблица 7.1 – Субъективные меры вероятности, шансы и отношения правдоподобия для отдельных симптомов у детей с ЛТИ (педиатрический этап)

№ п/п	Симптом, признак	$P(S D_1)$ ЛТИ1	$P(S D_2)$ НТ0	Шанс для пациентов с ЛТИ	Отношение правдоподобия для пациентов с ЛТИ $L(D_1 S)$
1	2	3	4	5	6
S1	возраст ребенка: 6 лет и старше	0,4000	0,1667	0,667	2,400
S2	возраст ребенка: до 3-х лет	0,5000	0,5000	1,000	1,000
S3	пол: женский	0,5333	0,4000	1,143	1,333
S4	курение в семье	0,2667	0,3667	0,364	0,727
S5	социально-сохранная семья	0,9000	0,8333	9,000	1,080
S6	осложнения беременности у матери	0,6333	0,6667	1,727	0,950
S7	выявление патологии при рождении	0,6333	0,6667	1,727	0,950
S8	масса тела при рождении до 2500 г	0,1000	0,0333	0,111	3,000
S9	грудное вскармливание	0,7667	0,7667	3,286	1,000
S10	выявление соматической патологии до 1 года	0,7000	0,4667	2,333	1,500
S11	эпизоды ОРВИ до 1 года	0,6000	0,2000	1,500	3,000
S12	дефицитные состояния до 1 года	0,4667	0,2333	0,875	2,000
S13	вакцинация БЦЖ (БЦЖ-М): р. 4 и > мм	0,7333	0,3667	2,750	2,000
S14	проф. прививки по календарю	0,3667	0,4333	0,579	0,846
S15	анемия	0,0667	0,0500	0,071	1,333

Продолжение таблицы 7.1

S16	отягощенный аллергологический анамнез	0,6333	0,3333	1,727	1,900
S17	аллергические заболевания верхних и нижних дыхательных путей	0,2000	0,0500	0,250	4,000
S18	перенесенные детские инфекции	0,5333	0,3667	1,143	1,455
S19	группа ЧБД	0,4000	0,4000	0,667	1,000
S20	хронические заболевания	0,3667	0,1667	0,579	2,200
S21	нарушения физического развития: ДМТ	0,1667	0,1333	0,200	1,250
S22	социальная гр. риска по туберкулезу	0,1333	0,1667	0,154	0,800
S23	медицинская гр. риска по туберкулезу	0,4000	0,4667	0,667	0,857
S24	установленный контакт с больным туберкулезом	0,1333	0,0667	0,154	2,000
S25	проба Манту с 2 ТЕ ППД-Л: положительная реакция	0,9500	0,3000	19,000	3,167
S26	проба с диаскинтестом: положительная реакция	0,1333	0,0500	0,154	2,667
S27	тест <i>in vitro</i> : определение уровня индуцированного ИФН-γ с ППД-Л, и.с.>3,9	0,8667	0,1333	6,500	6,500

По данным признакам, указанным в таблице 7.1, установлено, в группе детей с ЛТИ1 старше 6 лет было 40,0% ($P=0,4000$). Та же величина, выраженная в шансах данного симптома для детей с ЛТИ, составила 0,667 к 1, то есть шанс иметь ЛТИ в возрасте старше 6 лет в 0,667 раза больше, чем не иметь ЛТИ. Таким образом, если шанс конкретного симптома, указанный в таблице 7.1, больше единицы, то данный симптом встречается чаще, чем в половине случаев. Наиболее важную информацию при вычислениях по формуле Байеса несет отношение правдоподобия (L), точнее, отношение двух правдоподобий (2):

$$L = \frac{P(S|D_i)}{P(S|D_j)} \quad (i \neq j) \quad (2)$$

Эта величина характеризует выраженность, специфичность симптома (признака) для ЛТИ, иными словами – его информативность при ЛТИ. Заметим, что при $L < 1$ анализируемый симптом (признак) скорее нехарактерен для данного заболевания, чем характерен. Так, для признака возраст старше 6 лет выраженность L составила 2,400.

По данным нашего исследования, наиболее часто у детей с ЛТИ регистрировались такие признаки как женский пол (53,33%); отсутствие

социальных рисков (90,0%); ОРВИ на первом году жизни (60,0%); отягощенный аллергологический анамнез (63,33%) и перенесенные детские инфекции (53,33%); формирование рубца после БЦЖ или БЦЖ-М 4 и более мм (73,33%). Среди специфических тестов при ЛТИ чаще регистрировали ответ на ППД-Л как в тесте *in vivo* (95,0%), так и *in vitro* (86,67%).

Результаты вычисления по формуле Байеса (2) показали, что также значимыми признаками для детей с ЛТИ являлись масса тела при рождении до 2500 г ($L=3,000$), дефицитные состояния до 1 года ($L=2,000$), анемия ($L=1,333$), аллергические заболевания верхних и нижних дыхательных путей ($L=4,000$), хронические заболевания ($L=2,200$), нарушения физического развития: ДМТ ($L=1,250$), установленный контакт с больным ТБ ($L=2,000$) и положительная реакция на АТР – диаскинтест ($L=2,667$).

При ранжировании (было выбрано 10 признаков с наиболее высокими показателями L) для оценки риска развития ЛТИ являлись диагностически значимыми: тест *in vitro* по определению уровня индуцированного ИФН- γ с ППД-Л (и.с. $>3,9$) – ранг 1 ($L=6,500$), отягощенный аллергологический анамнез за счет аллергических заболеваний верхних и нижних дыхательных путей ($L=4,000$) – ранг 2, положительная реакция на 2 ТЕ ППД-Л при проведении пробы Манту ($L=3,167$) – ранг 3, эпизоды ОРВИ на первом году жизни ($L=3,000$) – ранг 4, масса тела при рождении до 2500 г ($L=3,000$) – ранг 5, положительная реакция на АТР ($L=2,667$) – ранг 6, возраст ребенка 6 лет и старше ($L=2,400$) – ранг 7, различные хронические заболевания ($L=2,200$) – ранг 8, дефицитные состояния на первом году жизни (рахит, анемия, гипотрофия) ($L=2,000$) – ранг 9, установленный контакт с больным ТБ ($L=2,000$) – ранг 10.

Для оценки операционных характеристик модуля программы № 1 был применен ROC-анализ [87]. Результаты ROC-анализа позволили определить оптимальные операционные характеристики модуля программы № 1 (чувствительность и специфичность) с расчетным пороговым уровнем принятия решения (рисунок 7.1, таблица 7.2).

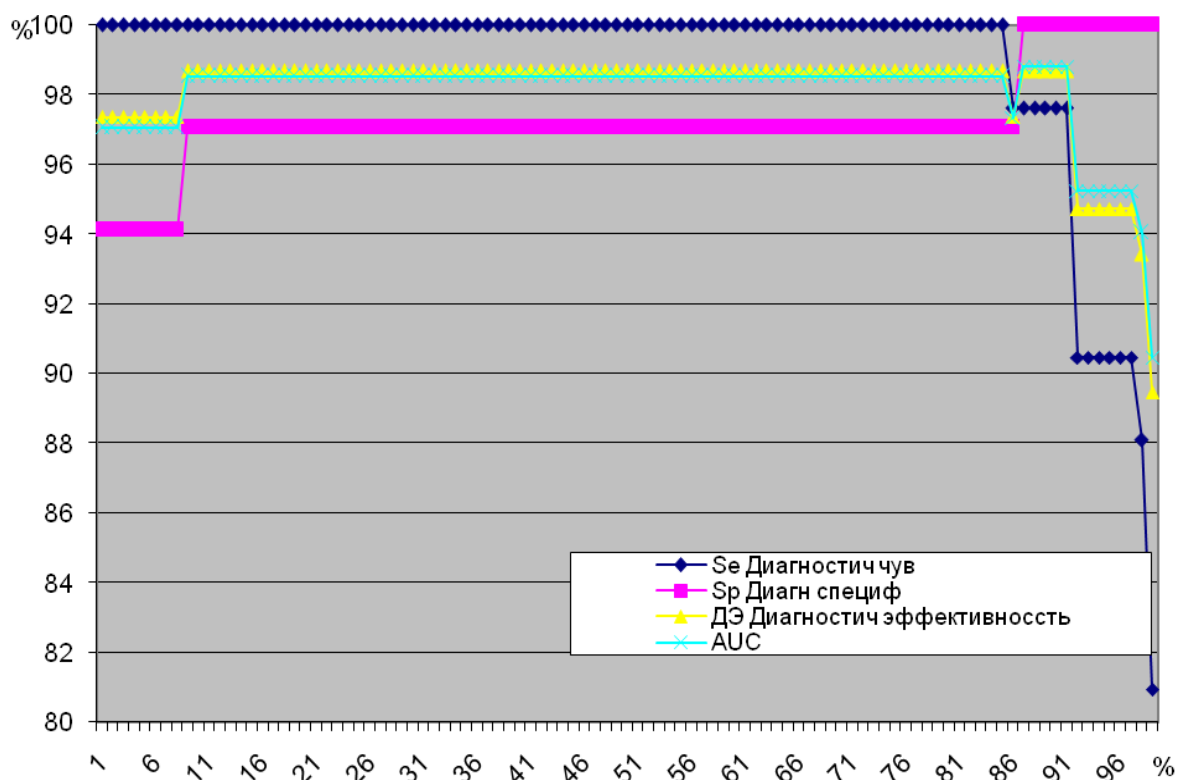


Рисунок 7.1 – ROC-анализ расчетного порогового уровня принятия решения для модуля программы № 1

Исходя из операционных характеристик разработанного модуля, был определен пороговый уровень. Точка разделения по данным ROC-анализа для модуля программы № 1 установлена на уровне 15%, что позволило ее рассматривать в качестве расчетного порогового уровня принятия решения. В случае превышения порога рисков значения пациентам может быть рекомендована консультация фтизиатра.

Таблица 7.2 – Диагностическая эффективность модуля программы № 1 «Выявление туберкулезной инфекции у детей»

Показатель	Значение	95% ДИ
Диагностическая чувствительность, %	98,8	96,358-100
Диагностическая специфичность, %	97,1	93,195-100
Диагностическая эффективность, %	98,0	94,869-100
Прогностическая ценность положительного результата, %	97,7	94,228-100
Прогностическая ценность отрицательного результата, %	98,5	95,735-100

Как видно из таблицы 7.2, была установлена высокая чувствительность (98,8%) и специфичность (97,1%) модуля программы № 1 по выявлению риска ЛТИ у детей на педиатрическом этапе. Также установили высокий относительный риск развития ЛТИ у детей в случае превышения порога рискованного значения по программе № 1 на уровне 65,442 (95% ДИ 4,177-1025,201).

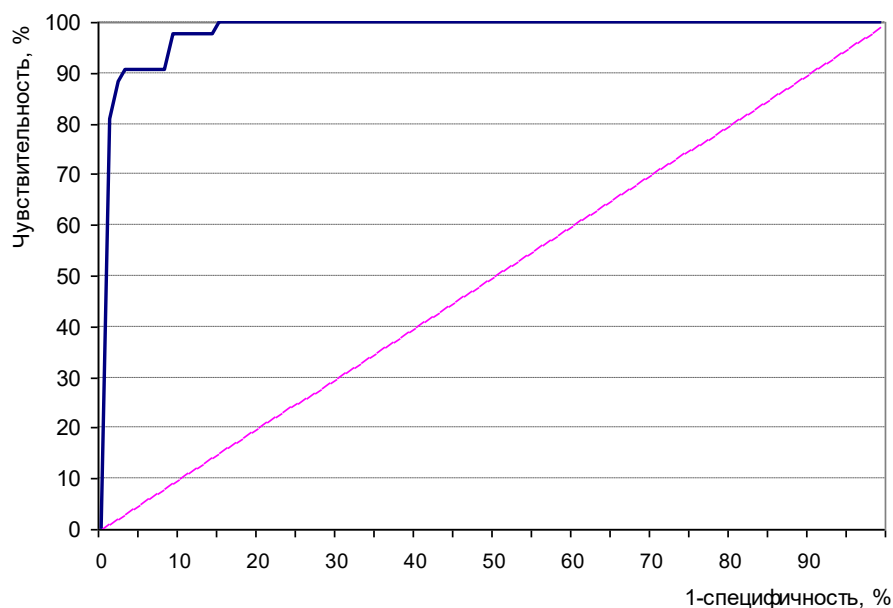


Рисунок 7.2 – ROC-анализ операционных характеристик модуля программы № 1 (чувствительность и специфичность)

Проведенный ROC-анализ операционных характеристик модуля программы № 1 (рисунок 7.2), судя по величине AUC, позволил качество модуля охарактеризовать как отличное.

Таким образом, разработанный модуль может быть использован на педиатрическом этапе выявления туберкулезной инфекции в виде диагностической компьютерной программы № 1 «Выявление туберкулезной инфекции у детей» для обработки поступающей информации о пациентах с подозрением на туберкулезную инфекцию и определения риска ЛТИ.

7.2. Оценка диагностической эффективности модулей программы № 2

«Ранняя диагностика туберкулезной инфекции у детей»

В модуле программы № 2 (для фтизиатрического этапа) для I этапа (приложение Б) вычисляли вероятность наличия раннего периода первичной туберкулезной инфекции у детей из группы риска по ЛТИ, используя частоты, приведенные в таблице 7.3 (частоты были рассчитаны для группы ЛТИ1 и ЛТИ2). Дополнительно к факторам риска для оценки РППТИ определяли уровень индуцированного ИФН- γ после стимуляции специфическими антигенами ППД-Л, CFP32B, Rv2660c, ESAT6, 85a, ESAT6-CFP10.

Таблица 7.3 – Субъективные меры вероятности, шансы и отношения правдоподобия для отдельных симптомов у детей с ЛТИ (фтизиатрический этап)

№ п/п	Симптом, признак	$P(S D_1)$ ЛТИ1	$P(S D_2)$ ЛТИ2	Шанс для пациентов с РППТИ	Отношение правдоподобия для пациентов с РППТИ $L(D_1 S)$
1	2	3	4	5	6
S1	возраст ребенка: 6 лет и старше	0,4000	0,6667	0,667	0,600
S2	возраст ребенка: до 3-х лет	0,5000	0,4000	1,000	1,250
S3	пол: женский	0,5333	0,4667	1,143	1,143
S4	курение в семье	0,2667	0,2333	0,364	1,143
S5	социально-сохранная семья	0,9000	0,7667	9,000	1,174
S6	осложнения беременности у матери	0,6333	0,4000	1,727	1,583
S7	выявление патологии при рождении	0,6333	0,5333	1,727	1,188
S8	масса тела при рождении до 2500 г	0,1000	0,0333	0,111	3,000
S9	грудное вскармливание	0,7667	0,7333	3,286	1,045
S10	выявление соматической патологии до 1 года	0,7000	0,5000	2,333	1,400
S11	эпизоды ОРВИ до 1 года	0,6000	0,3000	1,500	2,000
S12	дефицитные состояния до 1 года	0,4667	0,4000	0,875	1,167
S13	вакцинация БЦЖ (БЦЖ-М): р. 4 и > мм	0,7333	0,5333	2,750	1,375
S14	проф. прививки по календарю	0,3667	0,6667	0,579	0,550
S15	анемия	0,0667	0,1000	0,071	0,667
S16	отягощенный аллергологический анамнез	0,6333	0,5333	1,727	1,188
S17	аллергические заболевания верхних и нижних дыхательных путей	0,2000	0,1667	0,250	1,200
S18	перенесенные детские инфекции	0,5333	0,6333	1,143	0,842
S19	группа ЧБД	0,4000	0,3333	0,667	1,200

Продолжение таблицы 7.3

S20	хронические заболевания	0,3667	0,2333	0,579	1,571
S21	нарушения физического развития: ДМТ	0,1667	0,1000	0,200	1,667
S22	социальная гр. риска по туберкулезу	0,1333	0,2333	0,154	0,571
S23	медицинская гр. риска по туберкулезу	0,4000	0,2333	0,667	1,714
S24	установленный контакт с больным туберкулезом	0,1333	0,0500	0,154	2,667
S25	проба Манту с 2 ТЕ ППД-Л: положительная реакция	0,9500	0,9500	19,000	1,000
S26	проба с диаскинтестом: положительная реакция	0,1333	0,0333	0,154	4,000
S27	тест <i>in vitro</i> определение уровня индуцированного ИФН-γ с ППД-Л, и.с.>3,9	0,6667	0,3333	2,000	2,000
S28	ИФН-γ с CFP32В, положительный	0,5333	0,1333	1,143	4,000
S29	ИФН-γ с Rv2660с, положительный	0,8333	0,3000	5,000	2,778
S30	ИФН-γ с ESAT6, положительный	0,5333	0,1667	1,143	3,200
S31	ИФН-γ с Ag85а, положительный	0,5000	0,0667	1,000	7,500
S32	ИФН-γ с ESAT6-CFP10, положительный	0,0667	0,0500	0,071	1,333

По данным, указанным в таблице 7.3, установлено, что среди детей с ЛТИ в ее раннем периоде (РППТИ) среди факторов риска дополнительно отметили наличие в анамнезе осложнения беременности у матери 63,33%, ранний перевод детей на искусственное вскармливание 76,67%. Среди специфических тестов при РППТИ чаще регистрировали ответ, помимо туберкулина, как в тесте *in vivo* (95,0%), так и *in vitro* (66,67%), на белки ранней стадии развития туберкулезной инфекции Rv2660с (83,33%), ESAT6 (53,33%), CFP32В (53,33%), 85а (50,0%).

В результате вычисления отношения правдоподобия также дополнительно значимыми признаками для детей с ЛТИ в РППТИ являлись: ранний возраст (L=1,250), курение в семье (L=1,143), масса тела при рождении до 2500 г (L=3,000), дети из группы часто и длительно болеющих (L=1,200) и из группы медицинского риска по туберкулезу (L=1,714), наличие иммунного ответа на стимуляцию специфическими белками 85а (L=7,500) и ESAT6-CFP10 (L=1,333).

При ранжировании признаков для оценки риска развития РППТИ диагностически значимыми являлись: наличие иммунного ответа в тесте *in vitro* по определению уровня индуцированного ИФН-γ при стимуляции Ag85а – ранг 1 (L=7,500), CFP32В (L=4,000) – ранг 2, положительная реакция на АТР (L=4,000) –

ранг 2, стимуляция на специфический белок ESAT6 (L=3,200) – ранг 3, масса тела при рождении до 2500 г (L=3,000) – ранг 4, стимуляция на специфический белок Rv2660с (L=2,778) – ранг 5, установленный контакт с больным ТБ (L=2,667) – ранг 6, перенесенные эпизоды ОРВИ до года (L=2,000) – ранг 7, определение уровня индуцированного ИФН- γ с ППД-Л (и.с.>3,9) (L=2,000) – ранг 7, медицинская группа риска по ТБ (L=1,714) – ранг 8, нарушения физического развития ДМТ (L=1,667) – ранг 9, в анамнезе осложнения беременности у матери (L=1,583) – ранг 10.

Результаты ROC-анализа позволили определить оптимальные операционные характеристики предлагаемого модуля программы № 2 (чувствительность и специфичность) ее I этапа с расчетным пороговым уровнем принятия решения (рисунок 7.3, таблица 7.4)

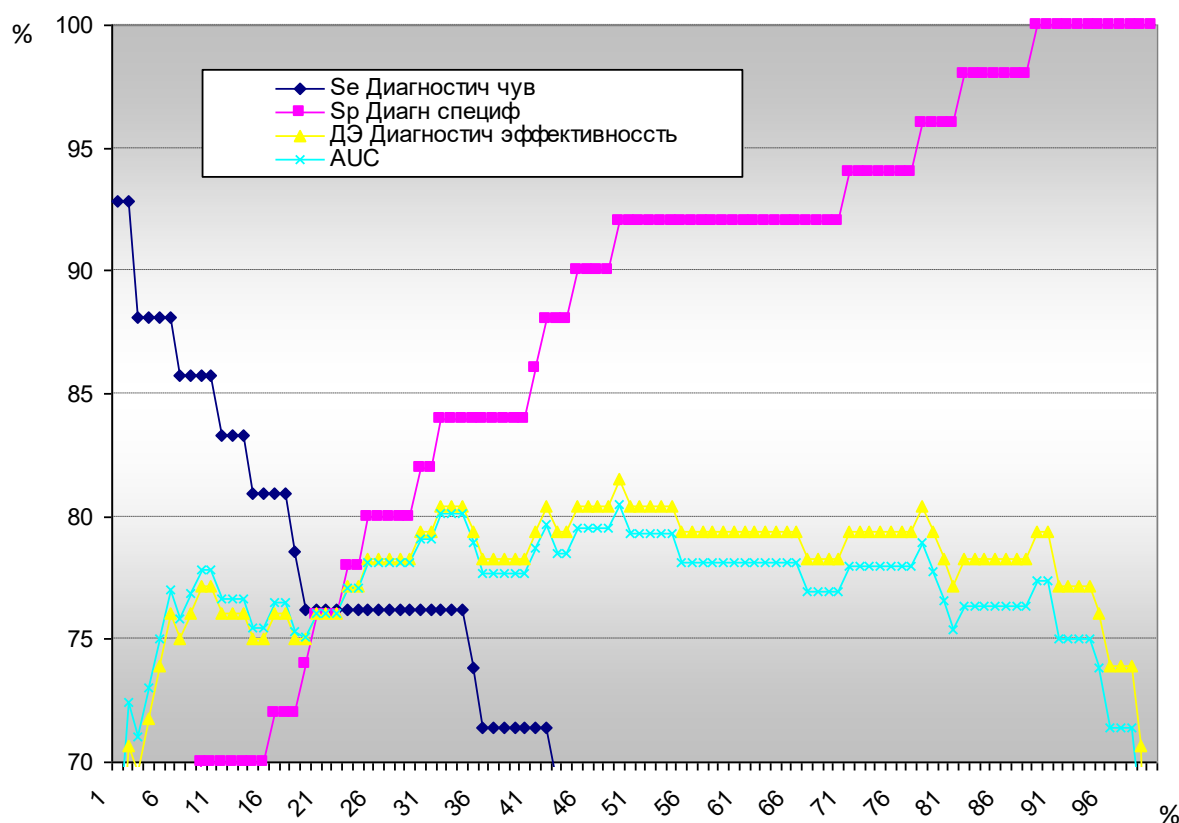


Рисунок 7.3 – ROC-анализ расчетного порогового уровня принятия решения для модуля программы № 2 (I этап)

Исходя из операционных характеристик разработанного модуля, также был

определен пороговый уровень. Точка разделения, по данным ROC-анализа для модуля программы № 2 (I этап), была установлена на уровне 33%, что позволило ее рассматривать в качестве расчетного порогового уровня принятия решения. В случае превышения порога рискованного значения пациентам может быть рекомендовано наблюдение фтизиатра и необходимость дополнительного обследования для исключения высокого риска ТБ.

Таблица 7.4 – Диагностическая эффективность модуля программы № 2 «Ранняя диагностика туберкулезной инфекции у детей» I этапа

Показатель	Значение	95% ДИ
Диагностическая чувствительность, %	76,2	67,309-85,071
Диагностическая специфичность, %	84,0	76,356-91,644
Диагностическая эффективность, %	80,4	72,163-88,707
Прогностическая ценность положительного результата, %	80,0	71,659-88,341
Прогностическая ценность отрицательного результата, %	80,8	72,551-88,987

Как видно из таблицы 7.4, была установлена чувствительность модуля программы № 2 (I этап) на уровне 76,2% и специфичность на уровне 84% по выявлению риска РППТИ у детей на фтизиатрическом этапе. Также установили высокий относительный риск развития РППТИ у детей в случае превышения порога рискованного значения по модулю программы № 2 на I этапе, коэффициент риска составил 4,160 (95% ДИ 2,333-7,416). По величине AUC качество модели можно охарактеризовать как хорошее (рисунок 7.4).

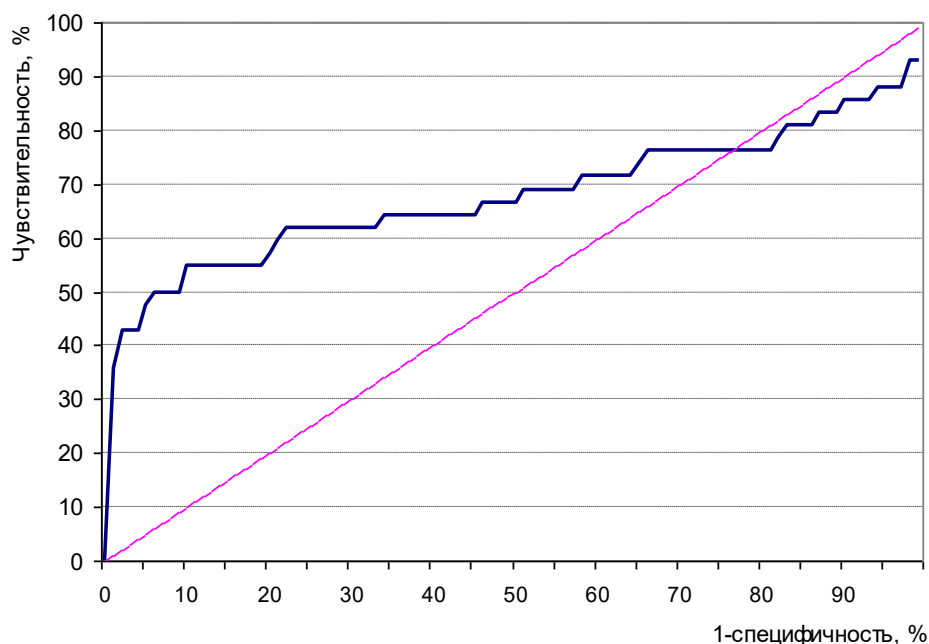


Рисунок 7.4 – ROC-анализ операционных характеристик модуля программы № 2, I этап (чувствительность и специфичность)

В модуле программы № 2 на II этапе (приложение В) вычисляли вероятность наличия высокого риска ТБ у детей с ЛТИ, используя частоты, приведенные в таблице 7.5 (частоты были рассчитаны для групп ТБ0 и ЛТИ1). Дополнительно для оценки риска ТБ, помимо факторов риска, определяли уровень индуцированного ИФН- γ после стимуляции специфическими антигенами ППД-Л, CFP32B, Rv2660с, ESAT6, 85a, ESAT6-CFP10, определяли полиморфизм генов *IFNG* и *MCPI*.

Таблица 7.5 – Субъективные меры вероятности, шансы и отношения правдоподобия для отдельных симптомов у детей с ТБ (фтизиатрический этап)

№ п/п	Симптом, признак	$P(S D_1)$ ТБ0	$P(S D_2)$ ЛТИ1	Шанс для пациентов с ТБ	Отношение правдоподобия для пациентов с ТБ $L(D_1 S)$
1	2	3	4	5	6
S1	возраст ребенка: 6 лет и старше	0,6333	0,4000	1,727	1,583
S2	возраст ребенка: до 3-х лет	0,3333	0,5000	0,500	0,667
S3	курение в семье	0,4000	0,2667	0,667	1,500
S4	социально-сохранная семья	0,2667	0,9000	0,364	0,296
S5	осложнения беременности у матери	0,6000	0,6333	1,500	0,947
S6	выявление патологии при рождении	0,5000	0,6333	1,000	0,789
S7	масса тела при рождении до 2500 г	0,0667	0,1000	0,071	0,667
S8	грудное вскармливание	0,5000	0,7667	1,000	0,652
S9	анемия	0,1667	0,0667	0,200	2,500
S10	отягощенный аллергологический анамнез	0,1333	0,6333	0,154	0,211
S11	аллергические заболевания верхних и нижних дыхательных путей	0,0500	0,2000	0,053	0,250
S12	хронические заболевания	0,1667	0,3667	0,200	0,455
S13	нарушения физического развития: ДМТ	0,2333	0,1667	0,304	1,400
S14	социальная гр. риска по туберкулезу	0,7586	0,1333	3,143	5,690
S15	медицинская гр. риска по туберкулезу	0,1034	0,4000	0,115	0,259
S16	установленный контакт с больным туберкулезом	0,7667	0,1333	3,286	5,750
S17	группа риска по результатам туберкулинодиагностики	0,9000	0,9500	9,000	0,947
S18	проба Манту с 2 ТЕ ППД-Л: положительная реакция	0,9333	0,9500	14,000	0,982
S19	проба с диаскинтестом: положительная реакция	0,9333	0,1333	14,000	7,000
S20	тест in vitro: определение уровня индуцированного ИФН- γ с ППД-Л, и.с.>3,9	0,7333	0,2667	2,750	2,750
S21	ИФН- γ с CFP32B, и.с.>0,4	0,4333	0,6000	0,765	0,722
S22	ИФН- γ с Rv2660с, и.с.>1,0	0,3000	0,7333	0,429	0,409
S23	ИФН- γ с ESAT6, и.с.>0,35	0,3333	0,6667	0,500	0,500
S24	ИФН- γ с Ag85a, и.с.>0,3	0,3000	0,7333	0,429	0,409
S25	ИФН- γ с ESAT6-CFP10, и.с.>0,2	0,9333	0,0667	14,000	14,000
S26	IFNG, T-1488C, TT	0,2000	0,6333	0,250	0,316
S27	IFNG, T-1488C, CC	0,1667	0,1667	0,200	1,000
S28	IFNG, T-1488C, TC	0,6333	0,2000	1,727	3,167
S29	MCPI, C-2508T, TT	0,4667	0,6333	0,875	0,737
S30	MCPI, C-2508T, CC	0,0667	0,0333	0,071	2,000
S31	MCPI, C-2508T, TC	0,4667	0,3333	0,875	1,400

По данным, указанным в таблице 7.5, установлено, что среди детей с ТБ

чаще, чем у детей с ЛТИ, регистрировали возраст ребенка 6 лет и старше (63,33%), социальные факторы риска по ТБ (75,86%), контакт с больным ТБ (76,67%). Среди специфических тестов при ТБ чаще регистрировали положительные реакции на АТР (93,33%), в тесте *in vitro* на ППД-Л (73,33%) и на гибридный белок (93,33%). Среди генотипов изучаемых полиморфных вариантов генов чаще регистрировали гетерозиготный генотип при полиморфизме Т-1488С гена *IFNG* (63,33%).

В результате вычисления отношения правдоподобия дополнительно значимыми признаками для детей с ТБ являлись: курение в семье ($L=1,500$), наличие анемии ($L=2,500$), нарушение физического развития, в частности ДМТ ($L=1,400$). При оценке генотипов дополнительно к гетерозиготному генотипу при полиморфизме Т-1488С гена *IFNG* ($L=3,167$) установили гетерозиготный ($L=1,400$) и гомозиготный по аллелю С ($L=2,000$) при полиморфизме С-2508Т гена *MCPI*.

При ранжировании были определены для оценки риска развития ТБ у детей диагностически значимые признаки (таблица 7.6).

Таблица 7.6 – Ранжирование признаков по их диагностической информативности у детей с туберкулезом

Признак (фактор риска)	Отношение правдоподобия для пациентов с ТБ $L(D1 S)$	Ранг
определение уровня индуцированного ИФН- γ с ESAT6-CFP10, и.с. $>0,2$	14,000	1
проба с диаскинтестом: положительная реакция	7,000	2
установленный контакт с больным туберкулезом	5,750	3
социальная группа риска по туберкулезу	5,690	4
генотип ТС гена <i>IFNG</i> (Т-1488С)	3,167	5
определение уровня индуцированного ИФН- γ с ППД-Л, и.с. $>3,9$	2,750	6
анемия	2,500	7
генотип СС гена <i>MCPI</i> (С-2508Т)	2,000	8
возраст ребенка: 6 лет и старше	1,583	9
курение в семье	1,500	10
генотип ТС гена <i>MCPI</i> (С-2508Т)	1,400	11
нарушения физического развития: ДМТ	1,400	11

Установлена высокая диагностическая ценность такого показателя как определение уровня индуцированного ИФН- γ с ESAT6-CFP10 (ранг 1), значим также был положительный результат пробы с АТР, контакт с больным ТБ и социальные факторы риска, а также гетерозиготный генотип при полиморфизме гена *IFNG* (T-1488C) (ранг 5). Меньшая информативность, но диагностически значимая, определена у таких факторов риска, как возраст ребенка (ранг 9), курение в семье (ранг 10), нарушение физического развития (ДМТ) и генотип ТС полиморфного варианта C-2508T гена *MCPI* (ранг 11).

Результаты ROC-анализа позволили определить оптимальные операционные характеристики предлагаемого модуля программы № 2 (чувствительность и специфичность) ее II этапа с расчетным пороговым уровнем принятия решения (рисунок 7.5, таблица 7.7).

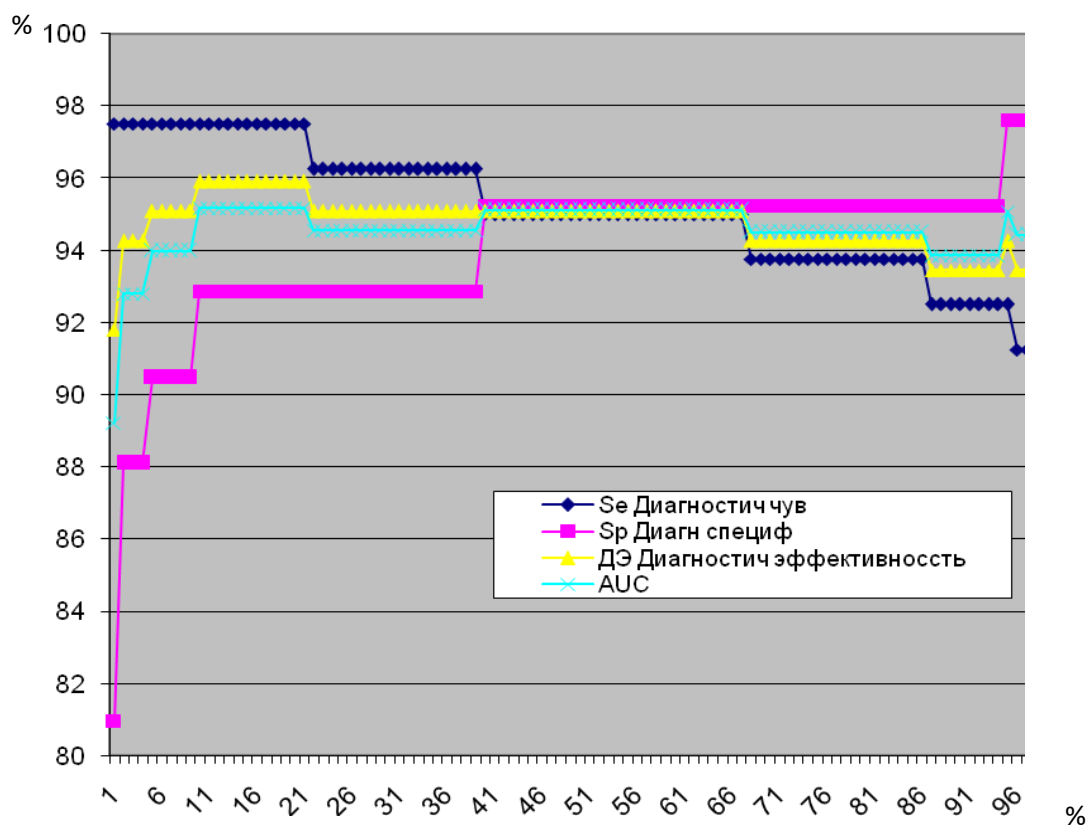


Рисунок 7.5 – ROC-анализ расчетного порогового уровня принятия решения для модуля программы № 2 (II этап)

Точка разделения по данным ROC-анализа для модуля программы № 2 (II этап) была установлена на уровне 50%, что позволило ее рассматривать в качестве

расчетного порогового уровня принятия решения. В случае превышения порога рисков значения пациентам может быть рекомендовано в условиях специализированного учреждения обследование для исключения ТБ.

Таблица 7.7 – Диагностическая эффективность модуля программы № 2 «Ранняя диагностика туберкулезной инфекции у детей» II этапа

Показатель	Значение	95% ДИ
Диагностическая чувствительность, %	95,0	91,054-98,946
Диагностическая специфичность, %	95,2	91,382-99,094
Диагностическая эффективность, %	95,1	91,166-98,998
Прогностическая ценность положительного результата, %	97,4	94,574-100,298
Прогностическая ценность отрицательного результата, %	90,9	85,704-96,115

Как видно из таблицы 7.7, была установлена высокая чувствительность (95,0%) и специфичность (95,2%) модуля программы № 2 (II этап) по выявлению риска ТБ у детей на фтизиатрическом этапе. Также был установлен высокий относительный риск развития ТБ у детей в случае превышения порога рисков значения на уровне 10,718 (95% ДИ 4,207-27,303).

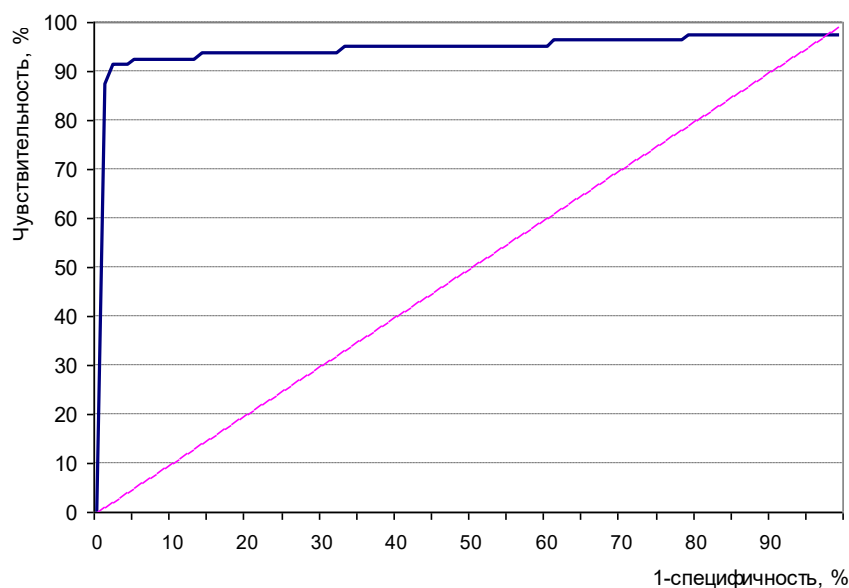


Рисунок 7.6 – ROC-анализ операционных характеристик модуля программы № 2, II этап (чувствительность и специфичность)

Проведенный ROC-анализ операционных характеристик модуля программы № 2 ее II этапа (рисунок 7.6), судя по величине AUC, позволил качество модуля охарактеризовать как отличное.

Таким образом, байесовские модули программы № 2 могут использоваться на фтизиатрическом этапе в виде компьютерной программы «Ранняя диагностика туберкулезной инфекции у детей» для обработки поступающей информации о пациентах с подозрением на ТБ. Использование этой программы позволит оптимизировать диагностический процесс за счет выявления лиц, у которых еще нет клинических проявлений заболевания, но определяется высокий риск его формирования.

7.3. Алгоритм персонифицированной диагностики туберкулезной инфекции у детей

На основе разработанных диагностических программ был разработан «Алгоритм персонифицированной диагностики туберкулезной инфекции у детей» (рисунок 7.7).

Предложенный алгоритм включал два этапа обследования: педиатрический и фтизиатрический.

Первый – педиатрический – этап предусматривал объем обследования для оценки риска ЛТИ у детей в условиях общей лечебной сети и решения вопроса необходимости дальнейшего обследования в условиях специализированного учреждения, диагностическая эффективность данного этапа составила 98% (таблица 7.2).

Второй этап – фтизиатрический, специализированный, где было выделено два этапа.

Фтизиатрический I этап предусматривал объем обследования для оценки РППТИ среди детей с риском ЛТИ и решения вопроса ведения данной категории пациентов в условиях противотуберкулезного учреждения, диагностическая эффективность данного этапа составила 80,4% (таблица 7.4).

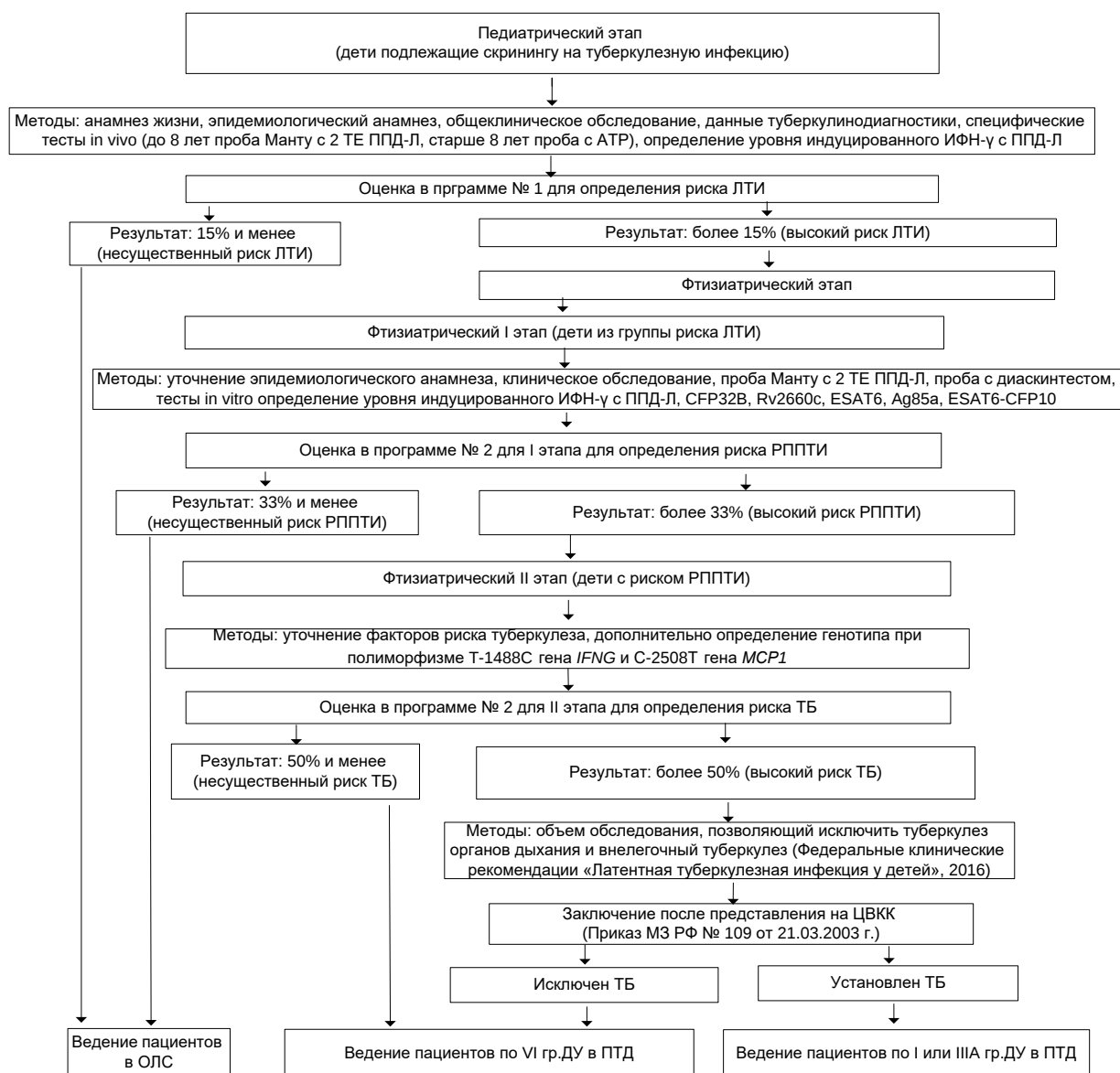


Рисунок 7.7 – Схема «Алгоритма персонифицированной диагностики туберкулезной инфекции у детей»

Фтизиатрический II этап предусматривал обследование детей в РППТИ для оценки риска развития ТБ и диагностических мероприятий для исключения заболевания, диагностическая эффективность данного этапа составила 95,1% (таблица 7.7).

Таким образом, нами получен достаточно высокий уровень диагностической эффективности «Алгоритма персонифицированной диагностики туберкулезной инфекции у детей», что позволяет его рекомендовать на этапе выявления туберкулезной инфекции у детей – в практике врача педиатра общей

лечебной сети и на этапе диагностики – в практике врача фтизиатра в условиях противотуберкулезных учреждений.

Примерами использования «Алгоритма персонифицированной диагностики туберкулезной инфекции у детей» явились следующие клинические случаи:

Пример 1.

Иван М., 17.03.09 г., направлен на консультацию в КПТД с диагнозом: Вираз туберкулиновых проб? по результатам туберкулинодиагностики в июле 2012 г. (инфильтрат 12 мм). Из анамнеза жизни известно, что ребенок неорганизованный, из социально-сохранной семьи, в течение года регистрировали до 4 эпизодов острых респираторных заболеваний, аллергический анамнез не был отягощен. Контакт с больным туберкулезом не установлен. По результатам вакцинации против туберкулеза (2009 г.) регистрировали формирование рубца 3 мм, проба Манту с 2 ТЕ ППД-Л через год после вакцинации – инфильтрат 3 мм, что свидетельствовало о малой результативности вакцинации. В динамике по результатам туберкулинодиагностики отметили сохранение сомнительной реакции на туберкулин. В 2012 г. взят на учет в КПТД по «6А» группе диспансерного учета, проведенный объем исследований свидетельствовал об отсутствии формирования локального туберкулеза. При взятии на учет регистрировали положительную реакцию на диаскинтест от августа 2012 г. – инфильтрат 4 мм. Рекомендована и проведена противотуберкулезная терапия 2 ПТП 6 мес. По результатам контрольного обследования: проба Манту с 2 ТЕ ППД-Л от 15.03.13 г. – инфильтрат 8 мм, проба с диаскинтестом от 15.03.13 г. отрицательная. При обследовании для снятия с учета по результатам пробы с диаскинтестом от 13.09.13 г. – инфильтрат 4 мм. Учитывая положительный результат теста, повторно рекомендовали МСКТ ОГК – без отрицательной динамики. Ребенок был оставлен под наблюдением фтизиатра по решению ЦВКК, второй курс превентивной терапии не был рекомендован. В 2014 г. по результатам диаскинтеста отметили нарастание чувствительности (инфильтрат 12 мм), проба Манту с 2 ТЕ ППД-Л – инфильтрат 10 мм, МСКТ ОГК без изменений,

была исключена внелегочная локализация специфического процесса. Контакт с больным ТБ не был установлен. Дополнительно рекомендовали проведение специфического иммунологического исследования *in vitro*, определение уровня индуцированного ИФН- γ специфическими антигенами ППД-Л, CFP32B, Rv2660c, ESAT6, 85a, ESAT6-CFP10 (08.06.2014), установили положительный результат на ППД-Л и гибрид. Провели генотипирование полиморфных маркеров T-1488C гена *IFNG* и C-2508T гена *MCP1* (08.06.2014). На основании полученных результатов обследования установили гетерозиготный генотип полиморфизма T-1488C гена *IFNG* и гетерозиготный генотип локуса C-2508T гена *MCP1*, что позволило прогнозировать развитие заболевания, уровень риска ТБ составил 99,84% (оценка рассчитана в программе № 2), при этом повторный курс превентивной противотуберкулезной терапии не был рекомендован. По результатам контрольного исследования (МСКТ ОГК в сентябре 2015 г.) выявили неполную кальцинацию лимфатического узла бифуркационной группы. На основании результатов комплексного обследования был выставлен туберкулез внутригрудных лимфатических узлов и рекомендована противотуберкулезная терапия в условиях специализированного стационара.

Пример 2.

Михаил Т., 18.09.11 г., направлен на консультацию в КПТД с диагнозом: Вираз туберкулиновых проб? по результатам туберкулинодиагностики в сентябре 2014 г. (инфильтрат 12 мм). Из анамнеза жизни известно, что ребенок неорганизованный, из социально-сохранной семьи, в течение года регистрировали до 4 эпизодов острых респираторных заболеваний, аллергический анамнез не был отягощен. Контакт с больным туберкулезом не установлен. По результатам вакцинации против туберкулеза (2011 г.) регистрировали формирование рубца 5 мм, проба Манту с 2 ТЕ ППД-Л через год после вакцинации – инфильтрат 8 мм, что свидетельствовало о результативной вакцинации. В динамике по результатам туберкулинодиагностики отметили сохранение положительной реакции на туберкулин. В октябре 2014 г. взят на учет в КПТД по «6А» группе диспансерного учета, проведенный объем исследований свидетельствовал об отсутствии

формирования локального туберкулеза. При взятии на учет регистрировали отрицательную реакцию на диаскинтест от сентября 2014 г. Ребенок был оставлен под наблюдением фтизиатра. В апреле 2015 г. по результатам диаскинтеста отметили нарастание чувствительности (инфильтрат 4 мм), проба Манту с 2 ТЕ ППД-Л – инфильтрат 10 мм, МСКТ ОГК без патологии, была исключена внелегочная локализация специфического процесса. При уточнении эпиданамнеза контакт с больным туберкулезом не был установлен. С целью уточнения активности туберкулезной инфекции и решения вопроса о курсе противотуберкулезной терапии дополнительно провели специфическое иммунологическое исследование, определение индуцированного ИФН- γ специфическими антигенами (20.05.2015): зарегистрировали положительную реакцию на ППД-Л – и.с.=6,2 в сочетании с Rv2660с – и.с.=3,4, ESAT-6 – и.с.=2,1 и отрицательную на ESAT6-CFP10 – и.с.=0,2, что подтвердило наличие ЛТИ, без локального специфического процесса. Для определения риска формирования туберкулеза провели генотипирование полиморфного маркера T-1488C гена *IFNG*, установили гомозиготный генотип по аллелю T полиморфизма T-1488C гена *IFNG*, что свидетельствовало о низком риске развития заболевания у ребенка. Риск ТБ установили на уровне 0,87% (рассчитан в программе № 2). На основании полученных результатов комплексного обследования установили ЛТИ с низким риском развития заболевания, что позволило ребенку не проводить превентивный курс противотуберкулезной терапии.

Пример 3.

Даниил М., 13.05.08 г., направлен на консультацию в КПТД с диагнозом: Тубинфицирование? по результатам туберкулинодиагностики с 2011 г. отмечаются положительные результаты, в КПТД не наблюдался. Из анамнеза жизни известно, что ребенок организованный, из социально-сохранной семьи, в течение года регистрировали до 6 эпизодов острых респираторных заболеваний, с 2012 г. установлен диагноз бронхиальной астмы, атопической (на момент направления в КПТД вне обострения, базисную терапию ребенок не получает). Контакт с больным туберкулезом не был установлен. По результатам вакцинации

против туберкулеза (2008 г.) регистрировали формирование рубца 2 мм, проба Манту с 2 ТЕ ППД-Л через год после вакцинации – инфильтрат 3 мм, что свидетельствовало о малой эффективности вакцинации. При взятии на учет регистрировали сомнительную реакцию на диаскинтест и положительную реакцию на туберкулин – инфильтрат 10 мм. МСКТ ОГК без патологии. С целью уточнения активности туберкулезной инфекции и решения вопроса о курсе противотуберкулезной терапии дополнительно провели специфическое иммунологическое исследование, определение уровня индуцированного ИФН- γ после стимуляции специфическими антигенами (08.05.2015): зарегистрировали положительную реакцию на ППД-Л и отрицательные на Rv2660c, ESAT6, ESAT6-CFP10, что подтвердило отсутствие активной туберкулезной инфекции. На основании полученных результатов комплексного обследования установили отсутствие активной туберкулезной инфекции, установлен диагноз инфицирование МБТ, ребенок учету в КПТД не подлежал.

ГЛАВА 8. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Туберкулез по-прежнему входит в число инфекционных болезней, уносящих наибольшее число жизней, так как остаются серьезные проблемы в лечении и профилактике [257; 258; 263; 429; 458]. По оценкам экспертов ВОЗ, около одной четверти населения мира имеют латентный ТБ [257]. У подавляющего большинства инфицированных отсутствуют признаки или симптомы ТБ. Риск того, что люди, инфицированные микобактериями туберкулеза, на протяжении своей жизни заболеют ТБ, составляет 5-15%, причем у части заболевание развивается в течение первых пяти лет с момента первичного инфицирования [180; 257; 363; 440]. Однако лица с ослабленной иммунной системой, такие как больные ВИЧ, недостаточностью питания или диабетом, употребляющие табак, подвергаются гораздо более высокому риску заболевания [18; 56; 91; 194; 257; 263; 448; 460]. По заключению экспертов ВОЗ, базовыми элементами «Глобальной стратегии борьбы с туберкулезом после 2015 года», являются мероприятия, ориентированные на пациента. 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 [26]. Существующая новая парадигма направлена на профилактику ТБ, при этом обращается внимание на резервуар скрытой инфекции, что важно для снижения заболеваемости ТБ, а в сочетании с лечением всех случаев ТБ должно привести к ликвидации ТБ к 2050 году [308; 316]. При этом факторы, способствующие прогрессированию ЛТИ до ТБ, в настоящее время не полностью изучены [316], а имеющиеся методы профилактики и диагностики не позволяют дифференцировать латентную инфекцию от активной [179; 247; 315; 458; 467; 477; 479]. В настоящее время идет активный поиск биомаркеров ранней диагностики ТБ и прогнозирования развития активной туберкулезной инфекции [316; 355; 467; 477]. При этом в условиях перехода к персонифицированной медицине должны учитываться молекулярно-генетические факторы, влияющие на развитие ТБ, что позволит прогнозировать

риски возможной патологии [49]. Учитывая изложенное, **целью** нашего исследования явилась разработка и обоснование персонифицированной системы ранней диагностики и прогнозирования течения туберкулезной инфекции на основании клинических, современных иммунологических и молекулярно-генетических данных для оптимизации ее профилактики у детей.

Для реализации поставленной цели нами в период с 2014 по 2018 гг. было выполнено проспективное исследование в несколько этапов трех групп наблюдения детей с разной степенью выраженности туберкулезной инфекции: 156 пациентов с ЛТИ (группа «ЛТИ»), 44 – не инфицированных МБТ (группа «НТ») и 110 – больных туберкулезом (группа «ТБ»).

Учитывая, что ТБ развивается в результате сложного взаимодействия МБТ, макроорганизма и социальных условий среды [118; 429], был проведен сравнительный анализ 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 [70], что подтвердили и наши исследования. Была установлена роль таких социальных факторов риска туберкулеза, как злоупотребление в семье алкоголем и наркотиками (ОШ 43,260), среднее и средне-специальное образование родителей (ОШ 33,650) и их безработица (отца – ОШ 3,726; матери – ОШ 2,937), неудовлетворительные жилищно-бытовые условия (ОШ 23,250), а также семьи малообеспеченные (ОШ 15,140), многодетные (ОШ 7,400) и неполные (ОШ 4,992). Впервые среди социальных факторов риска мы выделили неорганизованного ребенка (ОШ 1,723). Пассивному курению сегодня придают достаточно большое значение, учитывая высокие риски инфицирования МБТ и развития ТБ [13, 258, 429]. Мы в своем исследовании также отметили увеличение риска развития ТБ при наличии курения в семье (ОШ 2,524). В клинических рекомендациях по ЛТИ [124] 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 значительно увеличивают риск прогрессирования инфекции [40; 78; 93; 105; 116; 124], при этом отмечается, что вклад каждого фактора может быть неравнозначным [59; 123; 124]. 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 ОШ 19,430, а для ЛТИ – ОШ 3,583.

Необходимо отметить, что, по мнению многих исследователей, основными факторами риска развития ТБ рассматриваются эпидемиологические (специфические) [40; 55; 59; 78; 91; 93; 105; 116; 123; 124]. Как показали результаты нашего исследования, низкий социальный уровень семьи мог способствовать реализации и других факторов риска, в том числе эпидемиологических – контакта по ТБ (ОШ 14,820), как семейного (ОШ 13,800), так и бытового (ОШ 4,288). 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» (ОШ 4,583), ранее на это также указывала в своих исследованиях А. М. Крюкова (2008) [55]. При этом в наших исследованиях установленный высокий процент пропуска «виража» (45,5%), даже при наличии контакта с больным 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) [124], по результатам нашего исследования было установлено, что инфицирование МБТ в раннем возрасте можно рассматривать в качестве фактора риска развития заболевания (ОШ 1,333).

Помимо социальных и эпидемиологических, значимая роль в качестве риска придается медико-биологическим факторам, в основном речь идет о хронических

заболеваниях, формирующих иммунодефицитные состояния [124; 176; 300; 424]. По результатам нашего исследования также было установлено, что неблагополучный биологический анамнез формировал риск развития ТБ (при ранжировании на уровне от 13 до 29 ранга).

В антенатальном периоде нами были выделены в качестве факторов риска ТБ: 1) вредные привычки матери вовремя беременности – курение, злоупотребление алкоголем, употребление наркотиков (ОШ 8,948); 2) активность хронических инфекций во время беременности (ОШ 3,846). В интранатальном – патология в период родов (преждевременные, запоздалые или затяжные роды) (ОШ 1,446). Но до настоящего времени эти факторы не рассматриваются как возможные риски развития ТБ у детей, поэтому не отмечены и в клинических рекомендациях по ЛТИ [124]. Однако ранее в единичных работах исследователями обращалось внимание, что на формирование риска заболевания влияли недоношенность и низкая масса тела при рождении [47; 55], искусственное вскармливание [55]. По результатам нашего исследования мы также пришли к выводу, что в раннем постнатальном периоде необходимо выделить несколько факторов, связанных с риском развития ТБ, таких как недоношенность (ОШ 2,382), низкая масса тела при рождении (до 2500 г) (ОШ 1,815) и задержка развития к году (ОШ 2,056), раннее начало (до двух месяцев) искусственного вскармливания (ОШ 3,235).

Необходимо отметить, что частые респираторные вирусные инфекции у детей, представленные в клинических рекомендациях в качестве фактора риска ТБ [15; 55; 58; 124], 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 связь с развитием ЛТИ (ОШ 1,212 и ОШ 1,759 соответственно) что могло свидетельствовать о недостаточном защитном эффекте местного иммунитета [23; 28; 35; 88].

В качестве специфического фактора риска ТБ в раннем постнатальном периоде рассматривается отсутствие [105; 124] или низкая результативность вакцинации БЦЖ (БЦЖ-М) [91; 105], что подтверждено и в нашей работе (ОШ

4,154). Дополнительно был установлен повышенный риск заболевания при иммунизации вакциной БЦЖ-М (ОШ 3,104). При этом вакцинация БЦЖ-М являлась прямым отражением отягощенного интранатального и раннего постнатального периодов, что могло повлиять на формирование адаптивного иммунитета.

Известно, что соматическая патология может приводить к истощению адаптационных механизмов [12] и повышению риска развития ТБ. По результатам нашего исследования в структуре соматической патологии было выделено несколько групп болезней, участвующих в формировании возникновения ТБ: некоторые инфекционные и паразитарные болезни (RR 2,836), болезни крови, кроветворных органов и отдельные нарушения, вовлекающие иммунный механизм (RR 1,335), болезни эндокринной системы, расстройства питания и нарушения обмена веществ (RR 1,985), болезни глаза и его придаточного аппарата (RR 1,12), болезни органов пищеварения (RR 1,722), болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани (RR 1,197), болезни мочеполовой системы (RR 1,031), врожденные аномалии [пороки развития], деформации и хромосомные нарушения (без MAPC) (RR 2,836).

Среди заболеваний, участвующих в формировании риска развития ЛТИ, была дополнительно выделена группа болезней органов дыхания (за исключением ОРВИ) (RR 3,173). Анализируя данную патологию, мы установили, что среди лиц с ЛТИ отмечались случаи бронхиальной астмы (8,3%) и аллергического ринита (12,2%), что также, как и частые ОРВИ, могли создавать условия для снижения местного иммунитета [23; 28; 35; 88]. При этом, согласно нашим данным, среди больных ТБ ни одного случая бронхиальной астмы не было зарегистрировано, что не согласуется с работами, указывающими на высокий риск развития ТБ при наличии хронической бронхолегочной патологии у детей [15; 96; 123]. 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 влияло на

эффективность формирования адаптивного иммунитета. При этом данные нарушения не увеличивали риск развития ТБ (RR 0,722).

По нашему мнению, учитывая выделенные факторы риска, способствующие формированию у детей ЛТИ и ТБ, необходимо оптимизировать подходы к формированию групп риска в зависимости от прогностической ценности уже известных факторов, а также выделенных дополнительно, имеющих значение в патогенезе заболевания. Учитывая полученные результаты, мы впервые отметили необходимость стратификации рисков для туберкулезной инфекции на разных этапах ее развития, так как вклад каждого из них не равнозначен. Так, для ТБ основными факторами риска явились социальные, для ЛТИ – медико-биологические.

Учитывая риски, на этапе формирования ЛТИ и ее прогрессирования с формированием локального специфического процесса у детей, необходимо было провести оценку состояния врожденного и адаптивного иммунитета. В исследованиях, начиная с Р. Коха (1891), была доказана ведущая роль клеточного иммунитета в базовой устойчивости к МБТ, но и до настоящего времени полностью не раскрыты механизмы развития ТБ [38; 118; 260; 278; 321; 423]. Поэтому в настоящее время сохраняется потребность в более комплексном понимании иммунных механизмов, лежащих в основе защиты от туберкулезной инфекции, которые обеспечивают баланс между хозяином и патогеном [263].

Проведенное нами исследование, включающее оценку иммунного статуса, позволило установить отсутствие вторичного иммунодефицита как при ЛТИ, так и ее прогрессировании.

Мы изучали ИФН- γ , основная функция которого – иммунорегуляция, включая активацию макрофагов, усиление Th-1-опосредованного ответа, индукцию экспрессии антигенов МНС типа II на антигенпрезентирующих клетках и др. [46; 142; 213; 260; 278; 396; 423; 451]. При этом сообщается, что ИФН- γ принимает активное участие как во врожденном, так и адаптивном иммунном ответе против туберкулезной инфекции [201; 275; 396].

Нами было установлено, что на этапе ЛТИ имеется активация клеточного ответа за счет повышения количества клеток с рецепторами CD3, CD4, CD8. CD4 Т-клетки играют центральную роль во всех адаптивных иммунных ответах [169; 174; 244; 260; 282; 343; 462]. Их активация наблюдается во время первичной реакции для защиты от возбудителя [260]. CD4 Т-лимфоциты действуют совместно с врожденными и другими адаптивными иммунными клетками для защиты от патогена, при этом поддерживают активацию CD8 Т-лимфоцитов [260]. Именно эти клетки являются основными продуцентами ИФН- γ и могут влиять на повышение уровня спонтанно синтезируемого цитокина [343; 451; 462], что установлено и в нашем исследовании ($p < 0,05$). При этом 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, как показали наши исследования, было недостаточным для защиты от прогрессирования инфекции. В работе Н. Хана с соавт. (2018) указывается, что при хронических инфекциях (таких как туберкулез) отмечается снижение функции Т-клеток, в том числе секреции цитокинов [423]. При активации клеточного иммунитета, как показано ранее, продуцентами ИФН- γ являются Th1-лимфоциты (основной активационный маркер – HLA DR) [292] и натуральные клетки-киллеры (CD16) [447; 451; 482], следовательно, наблюдаемое в нашем исследовании снижение количества NK-клеток (natural killer cells, NK cells) ($p \leq 0,05$) при ТБ могло привести к снижению уровня синтеза цитокина [246; 281], а недостаток ИФН- γ мог стать причиной уменьшенной активности цитотоксических клеток. В то же время наши исследования 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 [318].

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 [34; 51; 165]. Такие

изменения содержания IgE мы выявили при ЛТИ. Однако при развитии ТБ мы отметили 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 [14; 115]. Наши исследования также подтвердили связь между активацией гуморального звена иммунитета ($p \leq 0,05$) и прогрессированием туберкулезной инфекции [36; 38].

ИФН- γ также рассматривается как важнейший фактор активации макрофагов [46; 142; 213]. Макрофаги вносят существенный вклад в реализацию врожденного иммунитета и в формирование адаптивного иммунитета [144; 446], обеспечивая антимикобактериальную защиту, в том числе через регуляцию синтеза про- и противовоспалительных цитокинов [205; 321; 328]. Цитокины привлекают главным образом нейтрофилы из кровотока и инициируют провоспалительный ответ, приводящий к поглощению и разрушению МБТ [391]. В нашем исследовании отмечено снижение фагоцитарной активности клеток при развитии ТБ, что 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 [276]. При развитии ТБ не было установлено изменений, указывающих на формирование иммунодефицита, хотя многими исследователями отмечено возникновение заболевания на фоне вторичного иммунодефицита [18; 56; 91; 194, 460].

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 .

Еще в работах М. М. Авербаха (1973) высказывалась гипотеза о существовании в лимфоцитах генов, контролирующих активацию иммунных клеток, синтезирующих медиаторы и влияющих на развитие специфического процесса [38]. В настоящее время исследователи также пытаются установить гены, вызывающие нарушения на уровне врожденного и адаптивного иммунитета [72; 211; 249; 278; 430; 461], в том числе определить генетические факторы риска ТБ [278]. В числе данных генов активно изучают ген *IFNG*, который связан с продукцией цитокина ИФН- γ [9; 92; 97; 369; 385; 430]. Идентификация генетических факторов риска ТБ [249; 430] позволит ближе подойти к расшифровке основ патогенеза данного инфекционного заболевания и объяснить, почему при наличии одних и тех же факторах риска ТБ у одних детей развивается заболевание, а у других нет.

Поэтому следующей задачей нашей работы явилась оценка значимости генетических факторов при развитии туберкулезной инфекции у детей. Учитывая, что по результатам нашего исследования ИФН- γ является одним из ключевых цитокинов иммунного ответа, связанного с развитием туберкулезной инфекции, мы также посчитали необходимым обратить внимание на ген, регулирующий этот цитокин. В настоящее время известно несколько полиморфных вариантов гена *IFNG*, связанных с ТБ [9; 92; 97; 369; 385]. Одним из перспективных для изучения при развитии ТБ рассматривался полиморфный вариант гена *IFNG* (T-1488C), так как наличие данной мутации (однонуклеотидной замене цитозина на тимин) может сказываться на экспрессии гена *IFNG* [72] и 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 микобактерий 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 неблагоприятного течения являлся гетерозиготный генотип полиморфизма T-1488C. Вероятный риск

прогрессирования заболевания при данном варианте генотипа установлен на уровне 74,07% (95% ДИ от 63,54 до 82,43%).

Нами была установлена 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 преимущественным 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).

На разных стадиях туберкулезной инфекции выявлено преобладание гетерозиготного генотипа изучаемого полиморфного варианта гена *IFNG* среди детей, имеющих различные 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; $p=0,000001$). Мы также определили высокую 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 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 [224; 310], так как, не затрагивая содержание наследственной информации, они играют большую роль в экспрессии генов [224; 265; 310]. Считается, что генетические и эпигенетические модификации, в том числе при развитии ТБ, могут зависеть от экологических и диетических факторов [333; 364]. В частности, факторы питания (дефицит метилата фолиевой кислоты, холина и метионина) [193; 209; 242; 333; 374; 378], химические вещества, в том числе табачный дым [155; 232; 293; 377; 420; 425; 444], неорганические загрязнения могут изменить эпигеном и способствовать развитию патологии [139; 265; 294; 305; 334; 364; 370; 374; 413; 414; 450]. В настоящее время именно эпигенетические процессы определяют комплексные отношения между генетикой, окружающей средой, образом жизни и заболеваниями [223]. Полученные нами результаты по оценке значимости полиморфизма гена *IFNG* для туберкулезной инфекции позволили установить, что гетерозиготный генотип полиморфного варианта Т-1488С 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 было установлено [72] влияние полиморфизма Т-1488С гена *IFNG* на уровень экспрессии гена *IFNG*, но не было изучено влияние на уровень 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 (CFP32B, Rv2660с, ESAT6, 85а, ESAT6-CFP10) было проведено дополнительное исследование. В результате нами впервые было определено, что полиморфизм гена *IFNG* (Т-1488С) ассоциирован с различной выраженностью иммунного ответа против отдельных МБТ-антигенов. Так, при формировании заболевания у

детей гетерозиготный генотип был связан с низким уровнем индуцированного ИФН- γ , что обуславливало неблагоприятное течение ТБ. Наличие гомозиготного генотипа по аллелю Т полиморфного варианта гена *IFNG* (Т-1488С) ассоциировался с высоким уровнем продукции ИФН- γ после специфической стимуляции, что подтверждало протективную роль генотипа ТТ.

Таким образом, можно 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*) [152; 405] в развитии воспаления, в том числе в формировании хронического (гранулематозного) воспаления [148; 211] и иммунного ответа, опосредованного Th2 типа [133; 296; 327; 339; 395; 398], 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*, с учетом того, что ранее были попытки оценить роль гена *MCP1* и его полиморфизм в восприимчивости к ТБ [72; 461]. 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 (рисунок 8.1).



Рисунок 8.1 – 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 [279; 349; 430]. При этом в ранних исследованиях указывалось на клиническое разнообразие туберкулезной инфекции, которое может рассматриваться как непрерывный процесс, простирающийся от стерилизации иммунитета, субклинического течения

заболевания, до активного процесса [254; 291; 380; 440]. Основным недостатком в настоящее время является отсутствие золотого стандарта диагностики и прогноза течения туберкулезной инфекции [179], т.к. ни один из иммунологических диагностических тестов не обладает достаточной чувствительностью или специфичностью для определения "места на спектре" туберкулезной инфекции [315]. Поэтому приоритетной задачей исследований последнего времени является поиск специфических биомаркеров для оценки всех этапов развития ТБ и возможности их использования в диагностических тестах [254; 316; 355; 467; 477; 484]. Мы оценили значимость 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 [480] 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. Предполагается, что он участвует в лизисе мембран фаголизосом и внешней мембраны макрофагов и тем самым способствует распространению микобактерий от одной клетки хозяина к другой [210; 226; 375]. A. Demissie с соавт. (2006) показали, что иммунные ответы на ESAT6 вероятнее всего связаны с активной инфекцией и ее прогрессированием [387]. По результатам других исследований данный белок (ESAT6) рассматривался как рано секретируемый антиген на этапе формирования противотуберкулезного иммунитета, в экспериментах была доказана его протективная роль [202; 381], и, как следствие, его можно было бы рассматривать в качестве маркера ЛТИ [234], что противоречит исследованиям, указывающим на связь ESAT6 с ее прогрессированием [387]. Таким образом, данный антиген [202; 381; 387], с одной стороны, можно было рассматривать в качестве маркера ЛТИ [234], с другой – активного специфического процесса [387]. По результатам нашего исследования было установлено, 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 незначим – и.с. $1,1 \pm 0,1$ ($U=4729$; $p=0,000$). Таким образом, полученные результаты четко показали «место на спектре» туберкулезной инфекции белка ESAT6, а именно на этапе ее раннего развития. Белок ESAT6 является одним из двух основных компонентов нового диагностического теста (T-SPOT.TB) [208], зарегистрированного на территории РФ и рекомендованного в качестве альтернативного метода диагностики туберкулезной инфекции [124; 211; 212]. При этом T-SPOT.TB (Oxford Immunotec, UK) не дифференцирует латентную и активную туберкулезную инфекцию [208; 316; 330; 396; 468]. Вторым белком, входящим в состав T-SPOT.TB, – CFP10. Мы в своем исследовании данный белок рассматривали в виде гибрида с ESAT6 – ESAT6-CFP10. Полученные результаты позволили говорить об изменении свойств белка ESAT6 в связанном с CFP10 состоянии и рассматривать их для оценки 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 незначим, в том числе на этапе первичного инфицирования МБТ (РППТИ) – и.с. $1,2 \pm 0,4$ ($U=1291,5$; $p<0,0001$).

Еще один хорошо изученный специфический белок – 85а – в настоящее время рассматривается для возможности применения с диагностической целью. Ранее исследования показали, что антигенный комплекс 85 проявляет высокую перекрестную реактивность с антигенами практически всех МБТ [387; 478], это может говорить о его низкой диагностической информативности для ЛТИ. Полученные результаты нашего исследования позволили говорить о Ag85а как о

белке, характеризующем латентную стадию туберкулезной инфекции, так как показатель индуцированного ИФН- γ с Ag85a 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%) ($p=0,0005$), выявлены положительные показатели и у детей с ПВА (17,6%), что, как мы и предполагали, снижало значимость белка для дифференциальной диагностики туберкулезной инфекции у детей.

Среди недавно идентифицированных белков был выбран один из перспективных антигенов МБТ – белок Rv2660с, который кодируется в области RD11 МБТ [273]. Считается, что данный белок может относиться к латентным антигенам [159; 355], хотя его функция в настоящее время до конца не определена [159]. Поэтому оценка возможности распознавания иммунными клетками белка Rv2660с на разных стадиях туберкулезной инфекции позволит расширить представление о новом антигене. Результаты нашего исследования впервые позволили говорить о белке Rv2660с как о маркере ранней стадии туберкулезной инфекции при первичном инфицировании МБТ. При определении индекса стимуляции (и.с.) ИФН- γ после индукции Rv2660с у больных ТБ ($1,6 \pm 0,3$), у детей с ЛТИ ($3,4 \pm 0,5$) и у не инфицированных МБТ ($1,0 \pm 0,2$) были установлены различия ($H=10,826$; $p=0,004$). 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 установили 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 (и.с.) (по Спирмену, $r=0,77$, $p=0,000$). Таким образом, все это позволяет утверждать, что основное «место белка на спектре» туберкулезной инфекции находится на уровне ранней стадии ее развития 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 белков для диагностики РППТИ.

Еще одним из недавно идентифицированных антигенов МБТ является белок CFP32В. Установлено, что данный белок стимулирует гуморальный ответ [199; 433], 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 [197; 199; 222; 233; 274; 368; 407; 433]. По результатам наших исследований установлено, что для оценки активности 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 учитывая, что ответ на CFP32В сохранялся при вакцинации БЦЖ или БЦЖ-М, возможна перекрестная реакция с МБТ, все это снижает диагностическую значимость специфического белка. 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: первый вариант был связан с выраженным ответом на ППД-Л и ESAT6-CFP10, а также слабовыраженным ответом на белки ранней стадии туберкулезной инфекции (ESAT6, Rv2660с, 85а, CFP32В); второй – с отсутствием ответа на стимуляцию антигенами; третий – с выраженным ответом на белки ранней стадии туберкулезной инфекции, слабовыраженным на ППД-Л и отсутствием ответа на гибридный белок. Среди белков ранней стадии туберкулезной инфекции по результатам ранжирования для ЛТИ были установлены значимые уровни для Rv2660с – $R\ 3,984$; ESAT6 – $R\ 3,411$, CFP32В – $R\ 3,016$ и 85а – $R\ 2,958$. 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 рассматривали в качестве риска развития ТБ (коэффициент риска составил 4,047; 95% ДИ 2,797 – 5,856).

Таким образом, мы установили, что белки ESAT6, Rv2660с, 85а и CFP32В можно рассматривать в качестве маркеров ЛТИ на ее ранней стадии развития, а гибридный белок ESAT6-CFP10, как показатель активной туберкулезной инфекции, – преимущественно на стадии развития заболевания или высокого риска ТБ. Антигены ППД-Л, 85а, CFP32В для решения вопросов дифференциальной диагностики ЛТИ и ПБА менее значимы, учитывая перекрестную реактивность между БЦЖ и МБТ. В связи с этим мы определили в качестве перспективных для оценки ЛТИ два антигена: ESAT6, Rv2660с, для активной – ESAT6-CFP10. Это 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.

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

Известно, что чувствительность теста на туберкулезную инфекцию с использованием одного антигена редко превышает 80% [158; 270]; при включении уже двух белков, как это установлено у T-SPOT.TB (Oxford Immunotec, UK), чувствительность составляет более 90% (92,0-94,1%) [330; 396]. 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, Rv2660c, 85a и CFP32B 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 [157; 190; 225; 235; 365, 457]. Это согласуется с принятой концепцией персонализированной медицины [49], 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 (для простоты расчета риска) 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 (ЛТИ) у детей на фтизиатрическом этапе расценивался как высокий, если был более 33%, а риск развития ТБ у детей с ЛТИ – более 50%.

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 с ППД-Л) у детей в случае превышения порога рискованного значения по модулю программы «Выявление туберкулезной инфекции у детей». Байесовский модуль (реализованный в компьютерной программе «Выявление туберкулезной инфекции у детей») для обработки поступающей информации о пациентах с подозрением на туберкулезную инфекцию и определения риска ЛТИ был использован в алгоритме для педиатрического этапа выявления инфекции.

Установили высокий риск РППТИ (RR 4,160; 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 модулю программы «Ранняя диагностика туберкулезной инфекции у детей» на II этапе вычисляли вероятность наличия высокого риска ТБ у детей, где помимо ранее установленных факторов риска (социальных и медико-биологических) и определения 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 *MCPI* (при регистрации гетерозиготных

генотипов) и установили высокий относительный риск развития ТБ у детей в случае превышения порога рисков 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.

Разработанный «Алгоритм персонифицированной диагностики туберкулезной инфекции у детей» на педиатрическом этапе в условиях общей лечебной сети позволял решить вопрос необходимости дальнейшего обследования в условиях специализированного учреждения, диагностическая эффективность данного этапа составила 98%. Фтизиатрический этап, специализированный, предусматривал объем обследования для оценки РППТИ среди детей с риском ЛТИ и решал вопрос ведения данной категории пациентов в условиях противотуберкулезного учреждения; 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 составила 95,1%.

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 позволяет его рекомендовать 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 как 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 НК-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) ($F_{92,515}$; $p=0,000$), с отягощенным наследственным анамнезом по ТБ ($F_{30,865}$; $p=0,000$), с отсутствием грудного вскармливания ($F_{8,31}$; $p=0,000001$), с формированием низкой результативности вакцинации БЦЖ (БЦЖ-М) ($F_{4,946}$; $p=0,004$). При развитии ТБ гетерозиготный генотип полиморфного варианта T-1488C гена *IFNG* связан с ведущими факторами в реализации высокого риска заболевания – низким достатком в семье ($F_{31,994}$; $p=0,0000$), отсутствием грудного вскармливания ($F_{6,965}$; $p=0,0004$) и курением в семье ($F_{5,193}$; $p=0,003$), 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 T 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 *MSPI* 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 ПБА (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 Rv2660c, 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, Rv2660c, 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, Rv2660c, 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* (T-1488C) или гена *MCPI* (C-2508T).
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 СОКРАЩЕНИЙ

Ag	антиген
BCG	бацилла Кальмета и Герена
CD	субпопуляция Т-клеток
HLA	главный комплекс гистосовместимости
IFN- γ	гамма-интерферон
<i>IFNG</i>	ген гамма-интерферона
<i>MCP1</i>	ген моноцитарного хемотаксического белка 1
RD	области различий
RR	коэффициент риска
Th-1	Т- хелперы 1 типа
Th-2	Т- хелперы 2 типа
АТР	аллерген туберкулезный рекомбинантный (диаскинтест)
БЦЖ	бацилла Кальмета и Герена
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ДИ	доверительный интервал
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДСТ	диаскинтест
ИФА	иммуноферментный анализ
ИФН- γ	гамма-интерферон
ЛТИ	латентная туберкулезная инфекция
МБТ	микобактерии туберкулеза
НТ	не инфицированных МБТ
ОШ	отношение шансов
ПВА	поствакцинальная аллергия
ППД-Л	очищенный белковый дериват Линниковой (туберкулин)
ПТА	положительная туберкулиновая анергия.
ПЦР	полимеразная цепная реакция
РПШТИ	ранний период первичной туберкулезной инфекции

СОЭ	скорость оседания эритроцитов
Т	тубинфицирование (инфицирование МБТ более года)
ТБ	туберкулез
ТЕ	туберкулиновые единицы

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аксенова, В. А. Современные подходы к скринингу туберкулезной инфекции у детей и подростков в России / В. А. Аксенова, Л. А. Барышникова, Н. И. Клевно // Медицинский совет. – 2015. – № 4. – С. 30-35.
2. Аксенова, В. А. Вакцинация туберкулеза у детей и подростков в Российской Федерации / В. А. Аксенова, Т. А. Севостьянова // Сборник тезисов II Конгресса национальной ассоциации фтизиатров. – Санкт-Петербург, 2013. – С. 16.
3. Аксенова, В. А. Достижения и перспективы в области профилактики, диагностики и лечения туберкулеза у детей / В. А. Аксенова // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2016. – Т. 61, № 5. – С. 6-13.
4. Аксенова, В. А. Туберкулез у детей и подростков в России к началу XXI в. / В. А. Аксенова, Т. А. Севостьянова, Н. И. Клевно // Вестник Росздравнадзора. – 2013. – № 3. – С. 19-23.
5. Актуальные вопросы массового обследования детского населения на туберкулез в современных условиях / В. А. Аксёнова [и др.] // Доктор. ру. – 2012. – Т. 8, № 76. – С. 27-29.
6. Александрова, Е. Н. Новые лабораторные тесты, основанные на определении продукции интерферона? In vitro, в диагностике латентной туберкулезной инфекции у больных ревматическими заболеваниями при планировании и проведении лечения ингибиторами фактора некроза опухоли? / Е. Н. Александрова, М. Е. Диатроптов, Е. Л. Насонов // Научно-практическая ревматология. – 2010. – № 4. – С. 54-59.
7. Алиева, М. А. Факторы риска развития туберкулеза легких у детей среднего и старшего школьного возраста в Азербайджане / М. А. Алиева, О. В. Великая // Туберкулёз и социально значимые заболевания. – 2014. – № 1-2. – С. 110-111.

8. Аллельный полиморфизм гена IFN γ при туберкулезе легких / Е. Л. Никулина [и др.] // Медицинская иммунология. – 2010. – Т. 12, № 3. – С. 259-264.
9. Аллельный полиморфизм генов IFNG и TGFB как фактор модуляции секреции цитокинов и подверженности туберкулёзу лёгких / О. И. Уразова [и др.] // Туберкулез и болезни легких. – 2010. – № 6. – С. 15-19.
10. Анализ иммунно-генетических показателей у больных пневмокониозом в послеконтактном периоде / Е. Л. Смирнова [и др.] // Медицина труда и экология человека. – 2015. – № 4. – С. 199-203.
11. Антигениндуцированный интерферон гамма при саркоидозе, туберкулезе и неспецифических воспалительных заболеваниях легких / Н. В. Макарова [и др.] // Вестник современной клинической медицины. – 2010. – Т. 3, № 4. – С. 25-28.
12. Антигенспецифическая иммунопрофилактика, иммунокоррекция и иммунореабилитация вторичных иммунодефицитных состояний / Б. Б. Першин [и др.] // Int. J. Immunorehabilitation. – 1997. – № 6. – С. 41-46.
13. Антонов, Н. С. Табакокурение и активный туберкулез: влияние и лечение / Н. С. Антонов, Г. М. Сахарова // РМЖ. – 2014. – № 5. – С. 366.
14. Балаболкин И. И. Атопический дерматит у детей / И. И. Балаболкин, В. Н. Гребенюк. – Москва : Медицина, 1999. – 238 с.
15. Белова, Е. В. Комплексная диагностика туберкулеза у длительно и часто болеющих детей с оценкой ряда показателей иммунитета / Е. В. Белова, В. А. Стаханов // Туберкулёз и социально значимые заболевания. – 2014. – № 1-2. – С. 112-113.
16. Беляева, С. В. Гены иммунного ответа и их комбинации в качестве предиктовых маркеров потенциального риска развития активного туберкулеза легких и его клинических фенотипов у представителей русской популяции Челябинской области : автореф. дис. ... канд. биол. наук / С. В. Беляева. – Челябинск, 2014. – 22 с.

- 17.Бердюгина, О. В. Особенности иммунологических показателей при туберкулезной инфекции органов дыхания у детей [Электронный ресурс] / О. В. Бердюгина, А. В. Мезенцева, Ю. П. Чугаев. – URL: <http://www.science-education.ru/pdf/2016/2/24197.pdf> 19/04/2016. – [Дата обращения: 27.10.2017].
- 18.Бородулин, Б. Е. Субпопуляционная структура и функциональные особенности CD4⁺ лимфоцитов у детей с положительными кожными туберкулиновыми пробами / Б. Е. Бородулин, Ж. П. Васнева, Т. Е. Ахмерова // Туберкулез и болезни легких. – 2013. – № 6. – С. 19-20.
- 19.Бычков, В. А. Анализ совместного влияния полиморфизмов генов системы интерферона OAS1, OAS3, PKR, IFNA17 и IFNG на предрасположенность к хроническому вирусному гепатиту С / В. А. Бычков, Н. В. Рязанцева, В. В. Новицкий // Бюллетень сибирской медицины. – 2011. – № 3. – С. 19-23.
- 20.Вивчар, И. С. Корреляционные связи показателей иммунного и цитокинового статуса у детей и подростков, больных туберкулезом легких / И. С. Вивчар, Н. П. Залецкий // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 6. – С. 601.
- 21.Возможности и ограничения теста QUANTIFERON-TB GOLD INTUBE в лабораторной диагностике туберкулеза легких / Е. В. Васильева [и др.] // Туберкулез и болезни легких. – 2013. – № 2. – С. 13–17.
- 22.Выявление туберкулёза и тактика диспансерного наблюдения за лицами из групп риска по заболеванию туберкулёзом с использованием препарата «ДИАСКИНТЕСТ®» (аллерген туберкулёзный рекомбинантный) / В. А. Аксёнова [и др.] // Туберкулез и болезни легких – 2010. – Т. 87, № 2. – С. 13-19.
- 23.Гельцер, Б. И. Система цитокинов и болезни органов дыхания / Б. И. Гельцер // Терапевтический архив. – 2002. – № 11. – С. 94–99.
- 24.Генетический контроль латентной туберкулезной инфекции / Т. К. Кондратьева [и др.] // Туберкулез и социально значимые заболевания. – 2013. – №. 2. – С. 61-66.

25. Генетический паспорт – основа индивидуальной и предиктивной медицины / под ред. В. С. Баранова. – Санкт-Петербург : Н-Л, 2009. – 528 с.
26. Глобальная стратегия и цели в области профилактики, лечения и борьбы с туберкулезом на период после 2015 г. [Электронный ресурс] : доклад Секретариата. Сто тридцать четвертая сессия. EB134/12. Пункт 6.1 предварительной повестки дня, 29 ноября 2013 г. / ВОЗ. Исполнительный Комитет. – Женева, 2013. – URL: http://mednet.ru/images/stories/files/statistika/protivotuberkuleznaya_slujba/B134_12-ru.pdf.
27. Глобальная стратегия и цели в области профилактики, лечения и борьбы с туберкулезом на период после 2015 г. [Электронный ресурс]. Шестое пленарное заседание. Шестидесят седьмая сессия Всемирной ассамблеи здравоохранения, 21 мая 2014 г. WHA67.1A67/VR/6 / ВОЗ. – URL: http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA67-REC1/A67_2014_REC1-ru.pdf.
28. Гнездилова, Е. В. Показатели цитогаммы жидкости бронхоальвеолярного лаважа у больных с хроническим обструктивным бронхитом / Е. В. Гнездилова // Казанский медицинский журнал. – 2002. – Т. 83, № 2. – С. 91–94.
29. Гончарова, И. А. Особенности экспрессии генов различных функциональных классов в зависимости от их структурного полиморфизма при хроническом вирусном гепатите С / И. А. Гончарова, Е. В. Белобородова // Генетика человека и патология. Проблемы эволюционной медицины : сб. науч. тр. – 2014. – Т. 14. – С. 106-109.
30. Джонсон, М. Новая вакцина H56 способна бороться с латентной туберкулезной инфекцией [Электронный ресурс] / М. Джонсон // Материалы и методы. – 2011. – № 1. – С. 45. – URL: <http://www.labome.ru/method/New-Tuberculosis-Vaccine-Fights-Latent-TB-Infection.html><http://dx.doi.org/10.13070/mm.ru.1.45>.

31. Дисфункции макрофагов, генерированных из моноцитов крови больных туберкулезом легких / Л. В. Сахно [и др.] // Бюллетень СО РАМН. – 2010. – Т. 30, № 2. – С. 101-108.
32. Доклад о глобальной борьбе с туберкулезом [Электронный ресурс] / Всемирная организация здравоохранения. – Женева, 2014. – 5 с. – URL: http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr14_execsummary_summary_ru.pdf
33. Дятлова, В. И. Получение рекомбинантных и синтетических антигенов *Mycobacterium tuberculosis* и перспективы их использования для серодиагностики туберкулеза : дис. ... канд. мед. наук / В. И. Дроздова. – Москва, 2015. – 209 с.
34. Ершов, Ф. И. Система интерферона в норме и при патологии / Ф. И. Ершов. – Москва : Медицина, 1996. – 239 с.
35. Зиновьев, А. С. Хроническое воспаление слизистых оболочек, интеграция иммунитета и регенерации / А. С. Зиновьев, А. В. Кононов // Архив патологии. – Т. 59, № 3. – 1997. – С. 18–26.
36. Иммунитет при туберкулезе и аспергиллезе (обзор) / Е. В. Свирщевская [и др.] // Проблемы медицинской микологии. – 2005. – Т. 7, № 1. – С. 3-13.
37. Иммуногенетический профиль больных туберкулезом легких и возможности совершенствования терапии / Л. И. Арчакова [и др.] // Вестник СПбГУ. Серия 11. Медицина. – 2009. – № 2. – С. 61-66.
38. Иммунология и иммунопатология туберкулеза / под ред. М. М. Авербаха. – Москва : Медицина, 1976. – 311 с.
39. Индикаторы качества медицинской помощи при туберкулезе : учеб.-метод. пособие для организаторов здравоохранения / Ю. В. Михайлова [и др.]. – Москва : РИО ЦНИИОИЗ МЗ РФ, 2013. – 36 с.
40. Инновационные подходы к выявлению и диагностике туберкулеза у детей / Ю. П. Чугаев [и др.] // Фтизиатрия и пульмонология. – 2014. – № 1 (8). – С. 119-126.

- 41.Интерферон- γ : биологическая функция и значение для диагностики клеточного иммунного ответа / А. А. Луцкий [и др.] // Журнал инфектологии. – 2015. – Т. 7, № 4. – С. 10-22.
- 42.Информативность определения спонтанной и специфической продукции цитокинов для оценки активности туберкулезного процесса / Е. В. Васильева [и др.] // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2012. – № 4. – С. 99–100.
- 43.Исследование антиген-стимулированной продукции γ -интерферона ex vivo в периферической крови у больных активным туберкулезом легких / З. М. Загдын [и др.] // Журнал инфектологии. – 2013. – Т. 5, № 2. – С. 22-31.
- 44.Казарян, Г. Г. Дизайн микобактериальных синтетических пептидов и их диагностическая эффективность / Г. Г. Казарян // Конференция молодых ученых «Молодежь и инновации Татарстана» : сб. материалов. – Казань, 2014. – С. 105-108.
- 45.Келасова, Н. В. Туберкулез органов дыхания у подростков. Основные причины формирования распространенных процессов : автореф. дис. ... канд. мед. наук / Н. В. Келасова. – Москва, 2007. – 25 с.
- 46.Кетлинский, С. А. Цитокины / С. А. Кетлинский, А. С. Симбирцев. – Санкт-Петербург : Фолиант, 2008. – 552 с.
- 47.Ким, А. Г. Современные эпидемиологические и организационные проблемы туберкулезной инфекции у детей в условиях мегаполиса : автореф. дис. ... канд. мед. наук / А. Г. Ким. – Санкт-Петербург, 2005. – 17 с.
- 48.Клинико-экономическое моделирование результатов использования T-SPOT. TB у иммуносупрессированных детей / В. И. Игнатьева [и др.] // Фармакоэкономика. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология. – 2014. – Т. 7, № 3. – С. 12-19.
- 49.Кобринский, Б. А. Персонализированная медицина: геном, электронное здравоохранение и интеллектуальные системы. Ч. 2. Молекулярная генетика и методы интеллектуального анализа / Б. А. Кобринский //

Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2017. – Т. 62, № 6. – С. 16-22.

50. Кожная проба с препаратом «Диаскинтест» – новые возможности идентификации туберкулезной инфекции / под ред. М. А. Пальцева. – 2-е изд., перераб. и доп. – Москва : Шико, 2011. – 256 с.
51. Козлов, В. К. Цитокиноterapia: патогенетическая направленность при инфекционных заболеваниях и клиническая эффективность : рук. для врачей / В. К. Козлов ; ГОУ ВПО С.-Петерб. гос. мед. акад. им. И. И. Мечникова [и др.]. – Санкт-Петербург : Альтер Эго, 2010. – 148 с.
52. Колокольцева, О. В. Туберкулез у детей невакцинированных БЦЖ / О. В. Колокольцева, Н. Н. Кабанец, О. В. Филинук // Сборник тезисов II Конгресса национальной ассоциации фтизиатров. – Санкт-Петербург, 2013. – С. 35.
53. Комбинированное определение спонтанной и антигениндуцированной продукции цитокинов для дифференциальной диагностики активного туберкулеза легких и латентной туберкулезной инфекции / Е. В. Васильева [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2013. – № 4. – С. 77–85.
54. Крук, Н. Н. Неспецифическая профилактика гриппа и других острых респираторных заболеваний в детских дошкольных учреждениях : автореф. дис. ... канд. мед. наук / Н. Н. Крук. – Санкт-Петербург, 1998. – 15 с.
55. Крюкова, А. М. Факторы риска развития локальных форм туберкулеза у детей в крупном промышленном центре : автореф. дис. ... канд. мед. наук / А. М. Крюкова. – Москва, 2008 – 22 с.
56. Кузнецов, Е. А. Эпидемиологическая и клиническая характеристика туберкулеза у детей старшего возраста и подростков в современных условиях : автореф. дис. ... канд. мед. наук / Е. А. Кузнецов. – Москва, 2008. – 26 с.
57. Кузьмина, И. К. Значение гиперергической чувствительности к туберкулину в диагностике туберкулеза органов дыхания и формировании групп риска у

- детей и подростков : автореф. дис. ... канд. мед. наук / И. К. Кузьмина. – Москва, 2009. – 27 с.
58. Кулакова, Н. В. Лечение неспецифической патологии в условиях детского туберкулезного санатория / Н. В. Кулакова, М. Э. Лозовская // Туберкулёз и социально значимые заболевания. – 2014. – № 1-2. – С. 118-119.
59. Кушнир, С. М. Факторы риска заболевания туберкулезом у детей дошкольного возраста с латентной туберкулезной инфекцией / С. М. Кушнир, А. А. Бекетова, Л. К. Антонова // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2011. – № 1. – С. 54-56.
60. Ластед Л. Введение в проблему принятия решений в медицине / Л. Ластед. – Москва : Мир, 1971. – 282 с.
61. Майданник, В. Г. Клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике заболеваний верхних дыхательных путей у детей / В. Г. Майданник. – Киев, 2003. – 177 с.
62. Матинян, Н. С. Теория и практика функционирования систем здравоохранения в условиях глобализации (на примере туберкулеза) : автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Н. С. Матинян. – Москва, 2009. – 48 с.
63. Медико-социальная характеристика семьи ребенка с туберкулезной инфекцией / В. И. Орел [и др.] // Вопросы современной педиатрии. – 2007. – Т. 6, № 5. – 28-31.
64. Мордовская, Л. И. Иммунологические показатели как критерий оценки активности туберкулезного процесса у инфицированных микобактериями туберкулеза и больных туберкулезом легких детей и подростков / Л. И. Мордовская, М. А. Владимирский, В. А. Аксенова // Acta Biomedica Scientifica. – 2011. – № 2. – С. 206-208.
65. Мордовская, Л. И. Иммунологические показатели как критерий оценки активности туберкулезного процесса у инфицированных микобактериями туберкулеза и больных туберкулезом легких детей и подростков // Л. И. Мордовская, М. А. Владимирский, В. А. Аксенова // Бюллетень ВСНЦ СО

РАМН: экспериментальные исследования в биологии и медицине. – 2011. – № 3 (78). – С. 206-208.

66. Новые гены-кандидаты подверженности туберкулезу, установленные с помощью построения и анализа ассоциативных сетей / Е. Ю. Брагина [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2015. – Т. 14, № 6. – С. 33-39.
67. О внесении изменений в приложение № 4 к Приказу МЗ РФ от 21.03. 2003 г. № 109 [Электронный ресурс] : приказ МЗ РФ № 855 от 29 октября 2009 г. – URL: <http://docs.cntd.ru/document/902182461>.
68. О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации (с изменениями на 5 июня 2017 года). Приложение № 4 [Электронный ресурс] : приказ МЗ РФ от 21.03.2003 № 109. – URL: <http://docs.cntd.ru/document/901868614>.
69. Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечения туберкулеза органов дыхания [Электронный ресурс] : приказ МЗ РФ от 29.12.2014 № 951. – URL: <http://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/70749840/>.
70. Об утверждении перечня социально значимых заболеваний и перечня заболеваний, представляющих опасность для окружающих [Электронный ресурс] : постановление Правительства РФ от 01.12.2004 г. № 715. – URL: <http://www.referent.ru/1/68092>.
71. Об утверждении санитарно-эпидемических правил СП 3.1.2.3114-13 «Профилактика туберкулеза» (с изменениями на 6 февраля 2015 года) [Электронный ресурс] : постановление Гл. гос. санитар. врача от 22 октября 2013 г. № 60. – URL: <http://docs.cntd.ru/document/499056594>.
72. Ожегова, Д. С. Функциональная вариабельность генов подверженности инфекционным заболеваниям : автореф. дис. ... канд. мед. наук / Д. С. Ожегова. – Томск, 2009. – 21 с.
73. Особенности иммунного ответа на туберкулин у детей с высокой чувствительностью к нему / Т. Е. Тюлькова [и др.] // Вопросы современной педиатрии. – 2010. – Т. 9, № 4. – С. 22-26.

74. Оценка протективного действия кандидатной противотуберкулезной вакцины «GamTBvac» и ее компонентов на лабораторных животных / А. М. Веселов [и др.] // Сборник тезисов II Конгресса национальной ассоциации фтизиатров. – Санкт-Петербург, 2013. – С. 248.
75. Петри, А. Наглядная медицинская статистика : пер. с англ. / А. Петри, К. Сэбин. – 2-е изд., перераб. и доп. – Москва : ГЭОТАР – Медиа, 2010. – 168 с.
76. Платонов, А. Е. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы / А. Е. Платонов. – Москва : Изд-во РАМН, 2000. – 52 с.
77. 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.
78. Поддубная, Л. В. Туберкулезная инфекция у детей и подростков из семей с высокой эпидемиологической опасностью по туберкулезу : автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Л. В. Поддубная. – Новосибирск, 2007. – 47 с.
79. Поиск оптимальной комбинации антигенов для серодиагностики туберкулеза / Е. В. Васильева [и др.] // Инфекция и иммунитет. – 2013. – Т. 3, № 3. – С. 235-242.
80. Попова, С. В. Применение нативных и генно-инженерных антигенов в качестве биолигандов в гидрозольных препаратах для экспрессной иммунодиагностики : автореф. дис. ... канд. биол. наук / С. В. Попова. – Москва, 2012. – 18 с.
81. Поспелов, А. Л. Роль мутаций некоторых генов естественного и приобретенного иммунитета в течении впервые выявленного туберкулеза у детей и подростков : автореф. дис. ... канд. биол. наук / А. Л. Поспелов. – Москва, 2011. – 23 с.
82. Потенциальные возможности вакцинного туляремийного вектора как основы рекомбинантной вакцины против туберкулеза / Т. Б. Кравченко [и

- др.] // Сборник тезисов II Конгресса национальной ассоциации фтизиатров. – Санкт-Петербург, 2013. – С. 265.
83. Предупреждение и раннее выявление туберкулеза у детей с потенциальным риском и реализованной ВИЧ-инфекцией в детской лечебной сети / С. Н. Шугаева [и др.] // Сибирский медицинский журнал (г. Иркутск). – 2011. – Т. 107, № 8. – С. 82-84.
84. Профилактическая педиатрия : рук. для врачей / М-во здравоохранения РФ [и др.] ; под ред. А. А. Баранова. – Москва : ПедиатрЪ, 2014. – 692 с.
85. Пузырев, В. П. Генетическое разнообразие народонаселения и болезни человека / В. П. Пузырев, М. Б. Фрейдин, А. Н. Кучер. – Томск : Печатная мануфактура, 2007. – 320 с.
86. Разработка и применение отечественной тест-системы диагностики туберкулезного инфицирования на основе количественного анализа индукции интерферона- γ в образцах цельной крови *in vitro* с использованием специфических рекомбинантных антигенов / М. А. Владимирский [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2010. – №. 1. – С. 49-54.
87. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – Москва : Медиа Сфера, 2006. – 312 с.
88. Роль изучения факторов местного иммунитета при патологии дыхательных путей / В. И. Совалкин [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2011. – № 10-1. – С. 151-154.
89. Роль регуляторных Т-клеток и эозинофилов в механизмах модуляции иммунного ответа при туберкулезе легких / В. В. Новицкий [и др.] // Иммунология. – 2012. – Т. 33, №. 4. – С. 184-188.
90. Руководство по ведению пациентов с латентной туберкулезной инфекцией / ВОЗ. – Женева, 2015. – 40 с.
91. Русских, Н. Ю. Факторы риска развития туберкулеза и особенности клинического течения заболевания у детей и подростков и социально-

- дезадаптированных семей : автореф. дис. ... канд. мед. наук / Н. Ю. Русских. – Москва, 2008. – 30 с.
92. Рыдловская, А. В. Функциональный полиморфизм TNF α и патология / А. В. Рыдловская, А. С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. – 2005. – Т. 4, № 3. – С. 4-9.
93. Сайфулин, М. Х. Туберкулез у детей как медико-социальная и организационная проблема регионального здравоохранения (на примере Астраханской области) : автореф. дис. ... д-ра мед. наук / М. Х. Сайфулин. – Санкт-Петербург, 2010. – 38 с.
94. Салина, Т. Ю. Иммунологические методы в дифференциальной диагностике / Т. Ю. Салина, Т. И. Морозова // Туберкулез и болезни легких. – 2011. – № 11. – С. 50-53.
95. Сергиенко, Д. Ф. Влияние полиморфизма T-1488C гена ИФН- γ на течение муковисцидоза у детей / Д. Ф. Сергиенко, Е. И. Кондратьева, Г. Н. Янкина // Актуальные вопросы современной медицины : материалы междунар. конф. Прикаспийских государств. – Астрахань, 2016. – С. 194-195.
96. Серебрякова, Т. В. Значение туберкулинодиагностики в выявлении туберкулёзной инфекции у детей с аллергической патологией : автореф. дис. ... канд. мед. наук / Т. В. Серебрякова. – Москва, 2009. – 29 с.
97. Симбирцев, А. С. Функциональный полиморфизм генов регуляторных молекул воспаления / А. С. Симбирцев, А. Ю. Громова // Цитокины и воспаление. – 2005. – Т. 4, № 1. – С. 3-10.
98. Сковрцова, Л. А. Клиническое течение ЛУ туберкулеза у подростков / Л. А. Сковрцова, М. Н. Кондакова, М. В. Павлова // Педиатрия. – 2005. – № 1. – С. 45-48.
99. Слободян, Л. М. Часто болеющие дети (медико-социальные аспекты, состояние иммунитета, пути оздоровления) / Л. М. Слободян, Н. С. Воронцова, Н. Б. Процайло // Педиатрия. – 1993. – № 1. – С. 45-48.

100. Слогодская, Л. В. Кожные иммунологические пробы при туберкулезе – история и современность / Л. В. Слогодская // Туберкулез и болезни легких. – 2013. – № 5. – С. 39-46.
101. Смирнова, Г. И. Аллергодерматозы у детей / Г. И. Смирнова. – Москва : БУК ЛТД, 1998. – 299 с.
102. Способ определения риска прогрессирования латентной туберкулезной инфекции у детей : пат. 2405151 Российская Федерация МПК G01N 33/49 / Ставицкая [и др.] ; патентобладатели Ставицкая Н. В., Дорошенкова А. Е., Анорина Е. Е. – № 2009126846 ; заявл. 20.03.2010 ; опубл. 27.11.2010, Бюл. № 33.
103. Способ оценки активности туберкулеза у детей и подростков : пат. 2498311 Российская Федерация МПК G01N 33/53 / Пацула Ю.И. [и др.]. ; патентообладатель Омская государственная медицинская академия (RU). – № 2011110673/15; заявл. 21.03.2011; опубл. 10.11.2013, Бюл. № 31. – 9 с.
104. Способ оценки активности туберкулезной инфекции у детей и подростков : пат. 2586279 Российская Федерация МПК G01N 33/535 / Лунин В. Г. [и др.] ; патентообладатель ФГБОУ «Федеральный НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи». – Оpubл. 10.06.2016.
105. Способ оценки эпидемической опасности очага туберкулезной инфекции для контактных детей и подростков : пат. № 2307594 Рос. Федерация / Касимцева О. В., Овсянкина Е. С. ; патентообладатель ГУ Центральный НИИ туберкулеза РАМН. – Заявл. 10.11.20015 ; опубл. 10.10.2007, Бюл. № 28. – 6 с.
106. Сравнительная оценка инновационных тестов в диагностике латентной и активной туберкулезной инфекции у детей / М. Э. Лозовская [и др.] // Педиатр. – 2014. – Т. 5, № 3. – С. 46-50.
107. Сравнительная ценность квантиферонового теста, неоптерина и специфических противотуберкулезных антител для клинико-лабораторной диагностики туберкулеза легких / Е. В. Васильева [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2013. – № 5. – С. 21-26.

108. Сравнительный анализ результатов тестов *in vitro* «Квантиферон» и «Тубинферон» и кожной пробы с Диаскинтестом / М. Э. Лозовская [и др.] // Сборник тезисов II Конгресса национальной ассоциации фтизиатров. – Санкт-Петербург, 2013. – С. 111.
109. Ставицкая, Н. В. Диагностика и лечебная тактика при латентной туберкулезной инфекции у детей : автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Н. В. Ставицкая. – Санкт-Петербург, 2011. – 45 с.
110. Ставицкая, Н. В. Исследование генетических факторов у детей с латентной туберкулезной инфекцией / Н. В. Ставицкая // Фундаментальные исследования. – 2010. – № 5. – С. 53-59.
111. Старшинова, А. А. Туберкулез у детей из семейного очага инфекции (диагностика, клиническое течение и профилактика) : автореф. дис. ... д-ра мед. наук / А. А. Старшинова. – Санкт-Петербург, 2013. – 46 с.
112. Стефани, Д. В. Иммунология и иммунопатология детского возраста : рук. для врачей / Д. В. Стефани, Ю. Е. Вельтищев. – Москва : Медицина, 1996. – 384 с.
113. Сухаленцева, Н. А. Роль аллельного полиморфизма генов цитокинов в иммунопатогенезе медленных вирусных инфекций : автореф. дис. ... канд. мед. наук / Н. А. Сухаленцева. – Томск, 2011. – 23 с.
114. Титов, Б. В. Полиморфизм генов, белковые продукты которых играют роль в развитии воспаления при ишемическом инсульте : автореф. дис. ... канд. мед. наук / Б. В. Титов. – Москва, 2014. – 18 с.
115. Торопова, Н. П. Экзема и нейродермит у детей / Н. П. Торопова, О. А. Синявская. – Свердловск, 1993. – 447 с.
116. Трифонова, Н. Ю. Исследование медико-организационных проблем распространённости туберкулёза в современных условиях крупного мегаполиса : автореф. дис. ... канд. мед. наук / Н. Ю. Трифонова. – Москва, 2010. – 48 с.

117. Туберкулез в Российской Федерации, 2012/2013/2014 гг. Аналитический обзор статистических показателей, используемых в Российской Федерации и в мире. – Москва, 2015. – 312 с.
118. Туберкулез у детей и подростков : рук. для врачей / под ред. Е. Н. Янченко, М. С. Греймер. – Ленинград : Медицина, 1987. – 288 с.
119. Туберкулез у детей и подростков в России (проблемы и пути решения в 21 веке) / В. А. Аксёнова [и др.] // Вопросы современной педиатрии. – 2011. – Т. 10, № 3. – С. 7-11.
120. Туберкулез. Основные факты [Электронный ресурс] / Всемирная организация здравоохранения. – Женева, 2015. – (Информ. бюл. № 104, март). – URL: <http://docplayer.ru/61416356-Tuberkulez-osnovnye-fakty-informacionnyy-byulleten-n-104-oktyabr-2015-g.html>.
121. Тюлькова, Т. Е. Прогнозирование перехода латентной туберкулезной инфекции в клинически манифестную форму у детей с выражом туберкулиновых проб или гиперергической реакцией на туберкулин / Т. Е. Тюлькова, А. С. Корначев // Вопросы современной педиатрии. – 2011. – Т. 10, № 3. – С. 65-69.
122. Уразова, О. И. Молекулярно-генетические факторы туберкулеза легких / О. И. Уразова // Бюллетень сибирской медицины. – 2010. – Т. 9, № 5. – С. 5-13.
123. Факторы риска развития туберкулеза у детей при наличии и отсутствии контакта с больным туберкулезом / Е. С. Овсянкина [и др.] // Туберкулез и болезни легких. – 2014. – № 10. – С. 20-23.
124. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению латентной туберкулезной инфекции у детей. – Москва : РООИ «Здоровье человека», 2015. – 36 с.
125. Флетчер, И. Н. Новые подходы к диагностике и профилактике детского туберкулеза / И. Н. Флетчер, Н. В. Жебуртович // Проблемы туберкулеза. – 2002. – № 4. – С. 3-5.

126. Фтизиатрия. Национальное руководство / Ассоц. мед. о-в по качеству, Рос. о-во фтизиатров ; ред. М.И. Перельман. – Москва : Гэотар-Медиа, 2010. – 504 с.
127. Хаитов, Р. М. Современные представления о защите организма от инфекции / Р. М. Хаитов, Б. В. Пинегин // Иммунология. – 2000. – № 1. – С. 61-64.
128. Халафян, А. А. STATISTICA 6. Статистический анализ данных : учебник / А. А. Халафян. – 3-е изд. – Москва : Бином-Пресс, 2008. – 512 с.
129. Шилова, М. В. Туберкулез в России / М. В. Шилова. – Москва, 2014. – 244 с.
130. Шмаков, П. Ю. Медико-социальная характеристика контингента часто болеющих детей с различным иммунным статусом и пути их оздоровления : автореф. дис. ... канд. мед. наук / П. Ю. Шмаков. – Рязань, 2002. – 23 с.
131. Экспериментальное исследование иммуностропного и протективного эффекта «бустирования» вакцины БЦЖ гриппозным вектором, экспрессирующим микобактериальные белки / Н. В. Заболотных [и др.] // Сборник тезисов II Конгресса национальной ассоциации фтизиатров. – Санкт-Петербург, 2013. – С. 257.
132. Эффективность определения первичной туберкулезной инфекции у детей и подростков с помощью анализа антиген-специфической продукции интерферона-гамма в образцах крови *in vitro* / М.А. Владимирский [и др.] // Туберкулез и болезни легких. – 2013. – № 6. – С. 22-23.
133. A functional promoter polymorphism in monocyte chemoattractant protein-1 is associated with increased susceptibility to pulmonary tuberculosis / P. O. Flores-Villanueva [et al.] // J. Exp. Med. – 2005. – Vol. 202, № 12. – P. 1649-1658.
134. A multistage tuberculosis vaccine that confers efficient protection before and after exposure / C. Aagaard [et al.] // Nat. Med. – 2011. – Vol. 17, № 2. – P. 189–194.

135. A mutation in the interferon gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection / M. J. Newport [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 1996. – Vol. 335, № 26. – P. 1941–1949.
136. A recombinant adenovirus expressing immunodominant TB antigens can significantly enhance BCG-induced human immunity / D. F. Hoft [et al.] // *Vaccine.* – 2012. – Vol. 30, № 12. – P. 2098–2108.
137. A refined symptom-based approach to diagnose pulmonary tuberculosis in children / B. J. Marais [et al.] // *Pediatrics.* – 2006. – Vol. 118. – e1350–1359.
138. A replication clock for *Mycobacterium tuberculosis* / W. P. Gill [et al.] // *Nat. med.* – 2009. – Vol. 15, № 2. – P. 211–214.
139. Aberrant DNA methylation and gene expression in livers of newborn mice transplacentally exposed to a hepatocarcinogenic dose of inorganic arsenic / Y. Xie [et al.] // *Toxicology.* – 2007. Vol. 236, № 1–2. – P. 7–15.
140. Accuracy of the Xpert MTB/RIF test for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in children admitted to hospital in Cape Town, South Africa: a descriptive study / M. P. Nicol [et al.] // *Lancet Infect. Dis.* – 2011. – Vol. 11. – P. 819–824.
141. Achkar, J. M. Antibody responses to mycobacterial antigens in children with tuberculosis: challenges and potential diagnostic value / J. M. Achkar, A. Ziegenbalg // *Clin. Vaccine Immunol.* – 2012. – Vol. 19, № 12. – P. 1898–906.
142. Aerosol infection of mice with recombinant BCG secreting murine IFN-gamma partially reconstitutes local protective immunity / A. L. Moreira [et al.] // *Microb. Pathog.* – 2000. – Vol. 29, № 3. – P. 175–185.
143. Ahmad, S. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection [Electronic resource] / S. Ahmad // *Clin. Dev. Immunol.* – 2011. – P. 814943. – doi: 10.1155/2011/814943.
144. Akira, S. Toll-like receptors: critical proteins link-ing innate and acquired immunity / S. Akira, K. Takeda, T. Kaisho // *Nat. Immunol.* – 2001. – Vol. 2, № 8. – P. 675–680.

145. Al-Zamel, F. A. Detection and diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* / F. A. Al-Zamel // *Expert Rev. Anti. Infect Ther.* – 2009. – Vol. 7, № 9. – P. 1099-1108.
146. An essential role for *phoP* in *Mycobacterium tuberculosis* virulence / E. Perez [et al.] // *Mol. Microbiol.* – 2001. – Vol. 41. – P. 179-187.
147. Analysis of cellular phenotypes that mediate genetic resistance to tuberculosis using a radiation bone marrow chimera approach / K. B. Majorov [et al.] // *Infect. Immunity.* – 2005. – Vol. 73. – P. 6174-6178.
148. Apoptosis-associated biomarkers in tuberculosis: promising for diagnosis and prognosis prediction / C. C. Shu [et al.] // *BMC Infect. Dis.* – 2013. – Vol. 13. – P. 45.
149. Apoptosis is an innate defense function of macrophages against *Mycobacterium tuberculosis* / S. M. Behar [et al.] // *Mucosal. Immunol.* – 2011. – Vol. 4, № 3. – P. 279–87. – doi: 10.1038/mi. 2011.3.
150. Apoptotic neutrophils augment their inflammatory response to *Mycobacterium tuberculosis* infection in human macrophages / H. Andersson [et al.] // *PLoS ONE.* – 2014. – № 9. – e101514.
151. Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cell and protect against tuberculosis / F. Winau [et al.] // *Immunity.* – 2006. – Vol. 24. – P. 105–117.
152. Appelberg, R. Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing / R. Appelberg // *Trends Microbiol.* – 2007. – № 2. – P. 87–92. – doi: 10.1016/j.tim.2006.11.009.
153. Apt, A. Tuberculosis: pathogenesis, immune response, and host genetics / A. Apt, T. Kondratieva // *Mol. Biol.* – 2008. – Vol. 42. – P.784-793.
154. Are the PE-PGRS proteins of *Mycobacterium tuberculosis* variable surface antigens? S. Banu [et al.] // *Mol. Microbiol.* – 2002. – Vol. 44, № 1. – P. 9-19.
155. Arnson, Y. Effects of tobacco smoke on immunity, inflammation and autoimmunity / Y. Arnson, Y. Shoenfeld, H. Amital / *J. Autoimmun.* – 2010. – Vol. 34, № 3. – P. J258–65.

156. Artificial intelligence – neural networks [Electronic resource]. [Cited July 2016]. – URL: www.tutorialspoint.com/artificial_intelligence/artificial_intelligence_neural_networks.html. – [Access date: 27.10.2017].
157. Asha, T. Diagnosis of tuberculosis using ensemble methods [Electronic resource]. [Cited Jan. 2017] / T. Asha, S. Natarajan, K. N. B. Murthy. – URL: www.meeting.edu.cn/meeting/UploadPapers/1282705343515.pdf. – [Access date: 27.10.2017].
158. Assessing the serodiagnostic potential of 35 Mycobacterium tuberculosis proteins and identification of four novel serological antigens / K. Weldingh [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2005. – Vol. 43. – P. 57–65.
159. Assessment of T cell response to novel Mycobacterium tuberculosis synthetic overlapping peptides mixtures (Rv2659 and Rv2660) and ESAT-6 in Egyptian patients / A. M. Salman [et al.] // Egypt J. Immunol. – 2014. – Vol. 21, № 2. – P. 75-83.
160. Autocrine transforming growth factor-beta1 promotes in vivo Th17 cell differentiation / I. Gutcher [et al.] // Immunity. – 2011. – Vol. 34, № 3. – P. 396–408. – doi: 10.1016/j.immuni.2011.03.005.
161. Boosting BCGwithMVA85A: the first candidate sub unit vaccine for tuberculosis in clinical trials / H. McShane [et al.] // Tuberculosis. – 2005. – Vol. 85, № 1-2. – P. 47–52.
162. Bottai, D. Mycobacterial PE, PPE and ESX clusters: novel insights into the secretion of these most unusual protein families / D. Bottai, R. Brosch // Mol. Microbiol. – 2009. – Vol. 73. – P. 325-328.
163. Brennan, M. J. The PE multigene family: a 'molecular mantra' for mycobacteria / M. J. Brennan, G. Delogu // Trends Microbiol. – 2002. – Vol. 10. – P. 246-249.
164. Brewer, T. F. Preventing tuberculosis with bacillus Calmette-Guerin vaccine: a meta-analysis of the literature / T. F. Brewer // Clin. Infect Dis. – 2000. – Vol. 31, suppl. 3. – P. S64–67.

165. Burtis, C. A. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics / C. A. Burtis, E. R. Ashwood, D. E. Bruns. – 4-th ed. – New Delhi : Elsevier, 2006. – 2412 p.
166. Cardona, P. J. A dynamic reinfection hypothesis of latent tuberculosis infection / P. J. Cardona // *Infection*. – 2009. – Vol. 37. – P. 80-86.
167. Cardona, P. J. On the nature of *Mycobacterium tuberculosis*-latent bacilli / P. J. Cardona, J. Ruiz-Manzano // *Eur. Respir. J.* – 2004. – Vol. 24. – P. 1044-1051.
168. Cardona, P. J. Revisiting the natural history of tuberculosis. The inclusion of constant reinfection, host tolerance, and damage-response frameworks leads to a better understanding of latent infection and its evolution towards active disease / P. J. Cardona // *Arch. Immunol. Ther. Exp (Warsz)*. – 2010. – Vol. 58, № 1. – P. 7-14.
169. CD4⁺ T cell persistence and function after infection are maintained by low-level peptide:MHC class II presentation / R. W. Nelson [et al.] // *J. Immunol.* – 2013. – Vol. 190. – P. 2828–34.
170. Cell biology of mycobacterium tuberculosis phagosome / I. Vergne [et al.] // *Annu Rev. Cell Dev. Biol.* – 2004. – Vol. 20. – P. 367-394.
171. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Updated guidelines for using Interferon Gamma Release Assays to detect *Mycobacterium tuberculosis* infection / G. H. Mazurek et al. // *MMWR Recomm. Rep.* – 2010. – Vol. 59, № RR-5. – P. 1–25.
172. Chan, E. D. What is the role of nitric oxide in murine and human host defense against tuberculosis? Current knowledge / E. D. Chan, J. Chan, N. W. Schluger // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* – 2001. – Vol. 25. – P. 606–612.
173. Chao, M. C. Letting sleeping dogs lie: does dormancy play a role in tuberculosis? // M. C. Chao, E. J. Rubin // *Annu Rev. Microbiol.* – 2010. – Vol. 64. – P. 293-311.

174. Characterization of pandemic influenza immune memory signature after vaccination or infection / O. Bonduelle [et al.] // J. Clin. Invest. – 2014. – Vol. 124. – P. 3129–3136.
175. Chronic pneumonia despite adaptive immune response to *Mycobacterium bovis* BCG in MyD88-deficient mice / D. M. Nicolle [et al.] // Lab. Invest. – 2004. – Vol. 84. – P. 1305–1321.
176. Commercial interferon gamma release assays compared to the tuberculin skin test for diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection in childhood contacts in the Gambia / I. M. Adetifa [et al.] // Pediatr. Infect Dis. J. – 2010. – Vol. 29, № 5. – P. 439–443.
177. Comparative evaluation of low-molecular-mass proteins from *Mycobacterium tuberculosis* identifies members of the ESAT-6 family as immunodominant T-Cell antigens / R. L. V. Skjot [et al.] // Infect. Immunity. – 2000. – Vol. 68, № 1. – P. 214–220.
178. Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens / P. R. Jungblut [et al.] // Mol. Microbiol. – 1999. – Vol. 33. – P. 1103–1117.
179. Comparing interferon-gamma release assays with tuberculin skin test for identifying latent tuberculosis infection that progresses to active tuberculosis: systematic review and meta-analysis / P. Auguste [et al.] // BMC Infectious Diseases. – 2017. – Vol. 17, № 1. – P. 200.
180. Comstock, G. W. The prognosis of a positive tuberculin reaction in childhood and adolescence / G. W. Comstock, V. T. Livesay, S. F. Woolpert // Am. J. Epidemiol. – 1974. – Vol. 99. – P. 131–138.
181. Connell, T. G. Advances in the diagnosis of pulmonary tuberculosis in HIV-infected and HIV-uninfected children / T. G Connell, H. J. Zar, M. P. Nicol // J. Infect. Dis. – 2011. – Vol. 204, suppl. 4. – P. S1151–S1158.

182. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO global surveillance and monitoring project / C. Dye [et al.] // JAMA. – 1999. – № 282. – P. 677–86.
183. Cooper, A. M. Cell-mediated immune responses in tuberculosis / A. M. Cooper // Annu. Rev. Immunol. – 2009. – Vol. 27. – P. 393–422.
184. Cooper, A. M. Role of innate cytokines in mycobacterial infection / A. M. Cooper, K. D. Mayer-Barber, A. Sher // Mucosal Immunol. – 2011. – Vol. 4. – P. 252–260.
185. Cooper, A. M. The role of cytokines in the initiation, expansion, and control of cellular immunity to tuberculosis / A. M. Cooper, S. A. Khader // Immunol. Rev. – 2008. – Vol. 226. – P. 191–204.
186. Cosma, C. L. The secret lives of the pathogenic mycobacteria / C. L. Cosma, D. R. Sherman, L. Ramakrishnan // Annu. Rev. Microbiol. – 2003. – Vol. 57. – P. 641–676.
187. Cruz, A. T. Pediatric tuberculosis / A. T. Cruz, J. R. Starke // Pediatr. Rev. – 2010. – Vol. 31. – P. 13–26.
188. Cui, H. L. Innate immunity in tuberculosis: host defense vs pathogen evasion / H. L. Cui, L. Haiying, G. Baoxue // Cell Mol. Immunol. – 2017. – Vol. 14. – P. 963–75.
189. Dallenga, T. Neutrophils in tuberculosis - first line of defence or booster of disease and targets for host-directed therapy? / T. Dallenga, U. E. Schaible // Pathog. Dis. – 2016. – Vol. 74, № 3. – P. ftw012. – doi: 10.1093/femspd/ftw012.
190. Dande, P. Acquaintance to artificial neural Networks and use of artificial intelligence as a diagnostic tool for tuberculosis: a review / P. Dande, P. Payal // Tuberculosis (Edinb.). – 2018. – Vol. 108. – P. 1–9.
191. Daniel, T. M. Mycobacterial antigens: a review of their isolation, chemistry and immunological properties / T. M. Daniel, B. W. Janicki // Microbiol. Rev. – 1978. – Vol. 42. – P. 84–113.
192. Daniel, T. M. The history of tuberculosis / T. M. Daniel // Respir. Med. – 2006. – Vol. 100, № 11. – P. 1862–1870.

193. de Kok, T. Mechanisms of combined action of different chemopreventive dietary compounds / T. de Kok, S. van Breda, M. Manson // Eur. J. Nutr. – 2008. – Vol. 47. – P. 51–59.
194. de Martino, M. Reflections on the immunology of tuberculosis: will we ever unravel the skein? / M. de Martino, L. Galli, E. Chiappini // BMC Infectious Diseases. – 2014. – Vol. 14, suppl. 1. – P. 1-6.
195. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence / S. T. Cole [et al.] // Nature. – 1998. – Vol. 393. – P. 537-544.
196. Deciphering the proteome of the in vivo diagnostic reagent “purified protein derivative” from *Mycobacterium tuberculosis* / Y. S. Cho [et al.] // Proteomics. – 2012. – Vol. 12. – P. 979–991.
197. Deglycosylation of the 45/47-kilodalton antigen complex of *Mycobacterium tuberculosis* decreases its capacity to elicit in vivo or in vitro cellular immune responses / F. Romain [et al.] // Infect. Immun. – 1999. – Vol. 67. – P. 5567–5572.
198. Delbridge, L. M. Innate recognition of intracellular bacteria / L. M. Delbridge, M. X. O'Riordan // Curr. Opin. Immunol. – 2007. – Vol. 19, № 1. – P. 10-16.
199. Delineation of human antibody responses to culture filtrate antigens of *Mycobacterium tuberculosis* / K. M. Samanich [et al.] // J. Infect. Dis. – 1998. – Vol. 178. – P. 1534–1538.
200. Deretic, V. Autophagy in infection, inflammation and immunity / V. Deretic, T. Saitoh, S. Akira // Nat. Rev. Immunol. – 2013. – Vol. 13, № 10. – P. 722–37. – doi: 10.1038/nri3532.
201. Desvignes, L. Dynamic roles of type I and type II interferons in early infection with *Mycobacterium tuberculosis* / L. Desvignes, A. J. Wolf, J. D. Ernst // J. Immunol. – 2012. – Vol. 188, № 12. – P. 6205–6215. – doi: 10.4049/jimmunol.1200255.

202. Detection of early secretory antigenic target-6 antibody for diagnosis of tuberculosis in non-human primates / G. V. Kanaujia [et al.]. – Comp. Med. – 2003. – Vol. 53. – P. 602–606.
203. Development of a standardized screening rule for tuberculosis in people living with HIV in resource-constrained settings: individual participant data metaanalysis of observational studies / H. Getahun [et al.] // PLoS Med. – 2011. – Vol. 8, № 1. – e1000391.
204. Developmental regulation of the human antibody repertoire / H. W. Schroeder Jr. [et al.] // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 1995. – Vol. 764. – P. 242–260.
205. Dey, B. Crosstalk between *Mycobacterium tuberculosis* and the host cell / B. Dey, W. R. Bishai // Seminars immunol. – 2014. – Vol. 26, № 6. – P. 486-496.
206. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP10 / L. A. van Pinxteren [et al.] // Clin. Diagn. Lab. Immunol. – 2000. – Vol. 7. – P. 155–160.
207. Diagnosis of tuberculosis in children in provinces of Argentina / M. D. Sequeira [et al.] // Medicina. – 2000. – Vol. 60. – P. 170 –178.
208. Diagnostic performance of interferon- γ release assay for lymph node tuberculosis / H. Jia [et al.] // Diagn. Microbiol. Infect Dis. – 2016. – Vol. 85, № 1. – P. 56-60.
209. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms / P. Knekt [et al.] // Am. J. Epidemiol. – 1997. – Vol. 146, № 3. – P. 223–230.
210. Differential influence of nutrient-starved *Mycobacterium tuberculosis* on adaptive immunity results in progressive tuberculosis disease and pathology / J. Dietrich [et al.] // Infect. Immun. – 2015. – Vol. 83, № 12. – P. 4731-4739.
211. Differential live *Mycobacterium tuberculosis*, M. bovis BCG-, recombinant ESAT6-, and culture filtrate protein 10-induced immunity in tuberculosis / Z. Hasan [et al.] // Clin. Vaccine Immunol. – 2009. – Vol. 16, № 7. – P. 991-998.
212. Dissecting mechanisms of immunodominance to the common tuberculosis antigens ESAT-6, CFP10, Rv2031c (hspX), Rv2654c (TB7.7), and Rv1038c

- (EsxJ) / C. S. L. Arlehamn [et al.] // J. Immunol. – 2012. – Vol. 188, № 10. – P. 5020–5031.
213. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice / A. M. Cooper [et al.] // J. Exp. Med. – 1993. – Vol. 178, № 6. – P. 2243–2247.
 214. Dynamic relationship between IFN-gamma and IL-2 profile of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cells and antigen load / K. A. Millington [et al.] // J. Immunol. – 2007. – Vol. 178, № 8. – P. 5217–5226.
 215. Dysfunction of natural killer T cells in patients with active *Mycobacterium tuberculosis* infection / S. J. Kee [et al.] // Infect. Immun. – 2012. – Vol. 80. – P. 2100-8. – doi: 10.1128/IAI.06018-11.
 216. Effect of HIV-1 infection on T-Cell-based and skin test detection of tuberculosis infection / M. X. Rangaka [et al.] // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2007. – Vol. 175, № 5. – P. 514–20.
 217. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature / G. A. Colditz [et al.] // JAMA. – 1994. – Vol. 271, № 9. – P. 698–702.
 218. Efficient protection against *Mycobacterium tuberculosis* by vaccination with a single subdominant epitope from the ESAT-6 antigen / A. W. Olsen [et al.] // Eur. J. Immunol. – 2000. – Vol. 30. – P. 1724–1732.
 219. Ehlers, S. Lazy, dynamic or minimally recrudescant? On the elusive nature and location of the mycobacterium responsible for latent tuberculosis / S. Ehlers // Infection. – 2009. – Vol. 37, № 2. – P. 87-95.
 220. Ehlers, S. The granuloma in tuberculosis: dynamics of a host–pathogen collusion / S. Ehlers, U. E. Schaible // Front. Immunol. – 2012. – Vol. 3, article 411. – P. 1-9.
 221. Ehrt, S. Mycobacterial survival strategies in the phagosome: defence against host stresses / S. Ehrt, D. Schnappinger // Cell Microbiol. – 2009. – Vol. 11. – P. 1170-1178.
 222. Enhanced patient serum immunoreactivity to recombinant *Mycobacterium tuberculosis* CFP32 produced in the yeast *Pichia pastoris* compared to

- Escherichia coli* and its potential for serodiagnosis of tuberculosis / C. Benabdesselem [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 44, № 9. – P. 3086-3093.
223. Epigenetics and proteomics join transcriptomics in the quest for tuberculosis biomarkers / M. M. Esterhuysen [et al.] // MBio. 2015. – Vol. 6, № 5. – e01187-15.
224. Epigenetics and trained immunity [Electronic resource] / C. D. van der Heijden [et al.] // Antioxid. Redox Signal. – 2017. – DOI: 10.1089/ars.2017.7310.
225. Er, O. Tuberculosis disease diagnosis using artificial neural networks / O. Er, F. Temurtas, A. C. Tanrikulu // J. Med. Syst. – 2010. – Vol. 34, № 3. – P. 299-302.
226. ESAT-6 from *Mycobacterium tuberculosis* dissociates from its putative chaperone cfp-10 under acidic conditions and exhibits membrane-lysing activity / M. I. de Jonge [et al.] // J. Bacteriol. – 2007. – Vol. 189, № 16. – P. 6028-6034.
227. ESAT-6 proteins: protective antigens and virulence factors? / P. Brodin [et al.] // Trends Microbiol. – 2004. – Vol. 12. – P. 500-508.
228. Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling / J. C. Betts [et al.] // Mol. Microbiol. – 2002. – Vol. 43, № 3. – P. 717-731.
229. Evaluation of DPPD, a single recombinant *Mycobacterium tuberculosis* protein as an alternative antigen for the Mantoux test / A. Campos-Neto [et al.] // Tuberculosis. – 2001. – Vol. 81, № 5-6. – P. 353-358.
230. Evaluation of tuberculin reactivity in BCG-immunized siblings / R. L. Sepulveda [et al.] // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 1994. – Vol. 149. – P. 620-624.
231. Evidence for occurrence of the ESAT6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG / M. Harboe [et al.] // Infect. Immun. – 1996. – Vol. 64, № 1. – P. 16-22.

232. Exposure to cigarette smoke inhibits the pulmonary T-cell response to influenza virus and *Mycobacterium tuberculosis* / Y. Feng [et al.] // Infect. Immun. – 2011. – Vol. 79, № 1. – P. 229–237.
233. Expression of *Mycobacterium tuberculosis* MPT64 in recombinant *Mycobacterium smegmatis*: purification, immunogenicity and application to skin tests for tuberculosis / P. W. Roche [et al.] // Clin. Exp. Immunol. – 1996. – Vol. 103. – P. 226–232.
234. Factors associated with humoral response to ESAT-6, 38 kDa and 14 kDa in patients with a spectrum of tuberculosis / V. M. Silva [et al.] // Int. J. Tuberc. Lung Dis. – 2003. – Vol. 7. – P. 478–484.
235. Farruggia, S. Implantable cardiverter defibrillator electrogram recognition with a multilayer perceptron / S. Farruggia, H. Yee, P. Nickolls // Pacing Clin. Electrophysiol. – 1993. – Vol. 161. – P. 228e34.
236. Fatal *Mycobacterium tuberculosis* infection despite adaptive immune response in the absence of MyD88 / C. M. Fremont [et al.] // J. Clin. Invest. – 2004. – Vol. 114. – P. 1790–1799.
237. Fine-needle aspiration biopsy: a first-line diagnostic procedure in paediatric tuberculosis suspects with peripheral lymphadenopathy / C. A. Wright [et al.] // Int. J. Tuberc. Lung Dis. – 2009. – Vol. 13. – P. 1373–1379.
238. Flesch, I. E. Attempts to characterize the mechanisms involved in mycobacterial growth inhibition by gamma interferon-activated bone marrow macrophages // I. E. Flesch, S. H. Kaufmann // Infect. Immun. – 1991. – № 59, № 6. – P. 3213–3218.
239. Flynn, J. L. Immune evasion by *Mycobacterium tuberculosis*: living with the enemy / J. L. Flynn, J. Chan // Curr. Opin. Immunol. – 2003. – Vol. 15. – P. 450–455.
240. Flynn, J. L. Immunology of tuberculosis enemy / J. L. Flynn, J. Chan // Annu. Rev. Immunol. – 2001. – Vol. 19. – P. 93–129.

241. Flynn, J. Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis / J. Flynn, J. Chan, P. Lin // *Mucosal Immunol.* – 2011. – Vol. 4, № 3. – P. 271-278.
242. Fowke, J. H. Head and neck cancer. A case for inhibition by isothiocyanates and indoles from cruciferous vegetables / J. H. Fowke // *Eur. J. Cancer Prev.* – 2007. – Vol. 16, № 4. – P. 348–356.
243. Frodsham, A. J. Genetics of infectious disease / A. J. Frodsham, A. V. Hill // *Hum. Mol. Genet.* – 2004. – Vol. 13, № 2. – P. 187-194.
244. Functional heterogeneity of memory CD4 T cell responses in different conditions of antigen exposure and persistence / A. Harari [et al.] // *J. Immunol.* – 2005. – Vol. 174. – P. 1037–1045.
245. Functional subsets of memory T cells identified by CCR7 expression / F. Sallusto [et al.] // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* – 2000. – Vol. 251. –P. 167-71.
246. Functionally relevant decreases in activatory receptor expression on NK cells are associated with pulmonary tuberculosis in vivo and persist after successful treatment / F. Bozzano [et al.] / *Int. Immunol.* – 2009. – Vol. 21, № 7. – P. 779–791.
247. Gamma interferon release assays for detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection / Pai M. [et al.] // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2014. –Vol. 27, № 1. – P. 3-20.
248. Genetic regulation of acquired immune responses to antigens of *Mycobacterium tuberculosis*: a study of twins in West Africa / A. Jepson [et al.] // *Infect. Immun.* – 2001. – Vol. 69. – P. 3989–3994.
249. Génétique humaine de la tuberculose / J. El Baghdadi [et al.] // *Pathologie-biologie (Paris)*. – 2013. – Vol. 61, № 1. – P. 11-16.
250. Gengenbacher, M. *Mycobacterium tuberculosis*: success through dormancy / M. Gengenbacher, S. H. E. Kaufmann // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2012. – Vol. 36. – P. 514–532.

251. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy / R. Brosch [et al.] // *Proceed. Nation. Acad. Sci.* – 2007. – Vol. 104, № 13. – P. 5596-5601.
252. Genome-wide expression profiling identifies type 1 interferon response pathways in active tuberculosis / T. H. Ottenhoff [et al.] // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7, № 9. – e45839.
253. Genomics of *Mycobacterium bovis* / S. V. Gordon [et al.] // *Tuberculosis (Edinb)*. – 2001. – Vol. 81, № 1-2. – P. 157-163.
254. Gideon, H. P. Latent tuberculosis: what the host "sees"? / H. P. Gideon, J. L. Flynn // *Immunol. Res.* – 2011. – Vol. 50, № 2-3. – P. 202-212.
255. Glickman, M. S. Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline / M. S. Glickman, W. R. Jacobs, Jr. // *Cell*. – 2001. – Vol. 104. – P. 477-485.
256. Global transcriptional profile of *Mycobacterium tuberculosis* during THP-1 human macrophage infection / P. Fontan [et al.] // *Infect. Immun.* – 2008. – Vol. 76. – P. 717-725.
257. Global Tuberculosis Report 2016 [Electronic resource] / World Health Organization. – Geneva : WHO Press, 2016. – 214 p. – URL: <https://www.afro.who.int/sites/default/files/2017-06/9789241565394-eng.pdf>.
258. Global tuberculosis Report 2017 [Electronic resource] / World Health Organization. – Geneva : WHO, 2017. – 249 p. – URL: <https://reliefweb.int/sites/reliefweb.int/files/resources/9789241565516-eng.pdf>.
259. Goude, R. The genetics of cell wall biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis* / R. Goude, T. Parish // *Future Microbiol.* – 2008. – Vol. 3, № 3. – P. 299–313.
260. Gray, J. I. The roles of resident, central and effector memory CD4 T-cells in protective immunity following infection or vaccination [Electronic resource] / J. I. Gray, L. M. Westerhof, M. K. L. MacLeod // *Immunology*. – 2018. – doi: 10.1111/imm.12929.
261. Greenberg, S. Phagocytosis and innate immunity / S. Greenberg, S. Grinstein // *Curr. Opin. Immunol.* – 2002. – Vol. 14, № 1. – P. 136-45.

262. Guidelines for intensified tuberculosis case-finding and isoniazid preventive therapy for people living with HIV in resource-constrained settings [Electronic resource]. – Geneva : WHO, 2011. – URL: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44472/9789241500708_eng.pdf?sequence=1. – [Access date: 27.10.2017].
263. Gupta, N. New players in immunity to tuberculosis: the host microbiome, lung epithelium, and innate immune cells / N. Gupta, R. Kumar, B. Agrawal // Front. Immunol. – 2018. – Vol. 9. – P. 709.
264. Hanekom, W. A. Immunological protection against tuberculosis / W. A. Hanekom, B. Abel, T. J. Scriba // S. Afr. Med. J. – 2007. – Vol. 97, № 10, pt. 2. – P. 973–977.
265. Hardy, T. M. Epigenetic diet: impact on the epigenome and cancer / T. M. Hardy, T. O. Tollefsbol // Epigenomics. – 2011. – Vol. 3, № 4. – P. 503–518.
266. Hartman, M. L. Interactions between naïve and infected macrophages reduce *Mycobacterium tuberculosis* viability / M. L. Hartman, H. Kornfeld // PLoS ONE. – 2011. – Vol. 6. – e27972.
267. He, H. *Mycobacterium tuberculosis* dormancy-associated antigen of Rv2660c induces stronger immune response in latent *Mycobacterium tuberculosis* infection than that in active tuberculosis in a Chinese population / H. He, H. Yang, Y. Deng // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2015. – Vol. 34, № 6. – P. 1103–1109.
268. Heritability analysis of cytokines as intermediate phenotypes of tuberculosis / C. M. Stein [et al.] // J. Infect Dis. – 2003. – Vol. 187. – P. 1679–1685.
269. Herzog, H. History of tuberculosis / H. Herzog // Respiration. – 1998. – Vol. 65, № 1. – P. 5–15.
270. Heterogeneous antibody responses in tuberculosis / K. Lyashchenko [et al.] // Infect. Immun. – 1998. – Vol. 66. – P. 3936–3940.
271. Hickman, S. P. *Mycobacterium tuberculosis* induces differential cytokine production from dendritic cells and macrophages with divergent effects on naive

- T-cell polarization / S. P. Hickman, J. Chan, P. Salgame // *J. Immunol.* – 2002. – Vol. 168, № 9. – P. 4636–4642.
272. High rates of clinical and subclinical tuberculosis among HIV infected ambulatory subjects in Tanzania / L. Mtei [et al.] // *Clin. Infect. Dis.* – 2005. – Vol. 40, № 10. – P. 1500–1507.
273. Higher human CD4 T cell response to novel *Mycobacterium tuberculosis* latency associated antigens Rv2660 and Rv2659 in latent infection compared with tuberculosis disease / L. Govender [et al.] // *Vaccine.* – 2010. – Vol. 29, № 1. – P. 51-57.
274. Homogeneity of antibody responses in tuberculosis patients / K. M. Samanich [et al.] // *Infect. Immun.* – 2001. – Vol. 69. – P. 4600–4609.
275. Host responses to melioidosis and tuberculosis are both dominated by interferon-mediated signaling / G. C. K. W. Koh [et al.] // *PloS One.* – 2013. – Vol. 8, № 1. – e54961.
276. Huaman, M. A. Elevated circulating concentrations of interferon-gamma in latent tuberculosis infection / M. A. Huaman, G. S. Deepe Jr, C. J. Fichtenbaum // *Pathog. Immun.* – 2016. – Vol. 1, № 2. – P. 291-303.
277. Huang, S. Targeting innate-like T cells in tuberculosis / S. Huang // *Front Immunol.* – 2016. – Vol. 7. – P. 594. – doi: 10.3389/fimmu.2016.00594.
278. Human genetics of tuberculosis: a long and winding road [Electronic resource] / L. Abel [et al.] // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.* – 2014. – Vol. 369, № 1645. – 2013. – doi:10.1098/rstb.2013.0428.
279. Human genetics of tuberculosis / J. El Baghdadi [et al.] // *Pathol. Biol (Paris).* – 2013. – Vol. 61, № 1. – P. 11-16.
280. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria / F. A. Verreck [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – Vol. 101, № 3. – P. 4560–4565.

281. Human NK cells directly recognize *Mycobacterium bovis* via TLR2 and acquire the ability to kill monocyte-derived DC / E. Marcenaro [et al.] // Int. Immunol. – 2008. – Vol. 9. – P. 1155–67.
282. Human T cell responses to Japanese encephalitis virus in health and disease / L. Turtle [et al.] // J. Exp. Med. – 2016. – Vol. 213. – P. 1331–1352.
283. Humoral Responses to Rv1733c, Rv0081, Rv1735c, and Rv1737c DosR Regulon-Encoded Proteins of *Mycobacterium tuberculosis* in Individuals with Latent Tuberculosis Infection / S. G. Kimuda [et al.] // J. Immunol. Res. – 2017. – P. 1593143. – doi: 10.1155/2017/1593143.
284. Hypoxia: a window into *Mycobacterium tuberculosis* latency / T. R. Rustad [et al.] // Cell Microbiol. – 2009. – Vol. 11. – P. 1151–1159.
285. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis / J. D. MacMicking [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 1997. – Vol. 94. – P. 5243–5248.
286. Identification of proteins from tuberculin purified protein derivative (PPD) by LC-MS/MS / S. Borsuk [et al.] // Tuberculosis (Edinb). – 2009. – Vol. 89. – P. 423–430.
287. Identification of RD5-encoded *Mycobacterium tuberculosis* proteins as b-cell antigens used for serodiagnosis of tuberculosis [Electronic resource] / M.-M. Zhang [et al.] // Clin. Development. Immunol. – 2012. – doi:10.1155/2012/738043.
288. IL-18 contributes to host resistance against infection with *Cryptococcus neoformans* in mice with defective IL-12synthes is through induction of IFN-gamma production by NK cells / K. Kawakami [et al.] // J. Immunol. – 2000. – Vol. 165. – P. 941–947.
289. Immunogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* RD1 region gene products in infected cattle / A. S. Mustafa [et al.] // Clin. Experim. Immunol. – 2002. – Vol. 130, № 1. – P. 37–42.

290. Immunological characterization of antigens encoded by the RD1 region of the *Mycobacterium tuberculosis* genome / P. N. Brusasca [et al.] // Scand. J. Immunol. – 2001. – Vol. 54. – P. 448–452.
291. Immunology studies in non-human primate models of tuberculosis / J. L. Flynn [et al.] // Immunol. Rev. – 2015. – Vol. 264, № 1. – P. 60-73.
292. Immunomodulatory functions of type I interferons / M. Gonzalez-Navajas [et al.] // J. Nat. Rev. Immunol. – 2012. – Vol. 12, № 2. – P. 125–135.
293. Impact of tobacco-smoke on key signaling pathways in the innate immune response in lung macrophages / M. A. Birrell [et al.] // J. Cell. Physiol. – 2008. – Vol. 214. – P. 27–37.
294. Impaired reproductive development in sons of women occupationally exposed to pesticides during pregnancy / H. R. Andersen [et al.] // Environ. Health Perspect. – 2008. – Vol. 116, № 4. – P. 566–572.
295. Impairment of *Mycobacterial* immunity on human IL-12 receptor deficiency / F. Altare [et al.] // Science. – 1998. – № 280. – P. 1432-1435.
296. In vivo properties of monocyte chemoattractant protein-1 / L. Gu [et al.] // J. Leukoc. Biol. – 1997. – Vol. 62, № 5. – P. 577-580.
297. Innate immunity holding the flanks until reinforced by adaptive immunity against *Mycobacterium tuberculosis* Infection / N. Khan [et al.] // Front. Microbiol. – 2016. – Vol. 7. – P. 328.
298. Interactions of attenuated *Mycobacterium tuberculosis* *phoP* mutant with human macrophages / N. L. Ferrer [et al.] // PLoS ONE. – 2010. – Vol. 5. – e12978.
299. Interferon-gamma release assay for the diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection in children younger than 5 years: a meta-analysis. / L. Ge [et al.] // Clinical Pediatrics. – 2014. – Vol. 53, № 13. – P. 1255–1263. – doi: 10.1177/0009922814540040.
300. Interferon-gamma release assays and childhood tuberculosis: systematic review and meta-analysis / A. M. Mandalakas [et al.] // Int. J. Tuberc. Lung Dis. – 2011. – Vol. 15, № 8. – P. 1018–1032.

301. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: a systematic review and meta-analysis / R. Diel [et al.] // Eur. Respir. J. – 2011. – Vol. 37. – P. 88–99.
302. Interferon-gamma-receptor deficiency in an infant with fatal bacille Calmette-Guérin infection / E. Jouanguy [et al.] // N. Engl. J. Med. – 1996. – Vol. 335, № 26. – P. 1956–1961.
303. Interferon- γ release assays for the diagnosis of tuberculosis and tuberculosis infection in HIV-infected adults: a systematic review and meta-analysis / M. Santin [et al.] // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7, № 3. – e32482.
304. Isoniazid for preventing tuberculosis in non-HIV infected persons [Electronic resource] / M. J. Smieja [et al.] // Cochrane Database Syst. Rev. – 2000. – Issue 2. – CD001363.
305. Jaenisch, R. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals / R. Jaenisch, A. Bird // Nat. Genet. – 2003. – Vol. 33. – P. 245–254.
306. Kana, B. D. Resuscitation promoting factors in bacterial population dynamics during TB infection / B. D. Kana, V. Mizrahi // Drug Discovery Today: Disease Mechanisms. 2010.
307. Kana, B. D. Resuscitation-promoting factors as lytic enzymes for bacterial growth and signaling / B. D. Kana, V. Mizrahi // FEMS Immunol. Med. Microbiol. – 2010. – Vol. 58. – P. 39-50.
308. Kawamura, L. M. Too little too late: Waiting for TB to come / L. M. Kawamura // Indian J. Tuberc. – 2018. – Vol. 65, № 2. – P. 106-108.
309. Keane, J. Tumor necrosis factor blockers and reactivation of latent tuberculosis / J. Keane // Clin. Infect. Dis. – 2004. – Vol. 39, № 3. – P. 300–302.
310. Kelsey, G. Single-cell epigenomics: Recording the past and predicting the future / G. Kelsey, O. Stegle, W. Reik // Science. – 2017. – Vol. 358, № 6359. – P. 69-75.

311. Laal, S. Y. Immune-based methods / S. Y. Laal, A. W. Skeiky // Tuberculosis and the tubercle bacillus / eds. S. T. Cole [et al.]. – Washington, 2005. – P. 71–83.
312. Lalvani, A. A 100 year update on diagnosis of tuberculosis infection / A. Lalvani, M. Pareek // Br. Med. Bull. – 2009. – Vol. 93. – P. 69–84.
313. Lalvani, A. Interferon gamma release assays: principles and practice / A. Lalvani, M. Pareek // Enferm. Infect. Microbiol. Clin. – 2009. – Vol. 28. – P. 245–52.
314. Lange, C. Advances in the diagnosis of tuberculosis / C. Lange, T. Mori / Respiriology. – 2010. – Vol. 15, № 2. – P. 220–240.
315. Latent tuberculosis infection: updated and consolidated guidelines for programmatic management [Electronic resource] / World Health Organization. – 2018. – URL: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/260233/9789241550239eng.pdf;jsessionid=6D1BB246312B378ACFEBF9BFFAFEB0ED?sequence=1>. – [Access date: 18.05.2018].
316. Latorre, I. Dormancy antigens as biomarkers of latent tuberculosis infection / I. Latorre, J. Domínguez // EBioMedicine. – 2015. – Vol. 2, № 8. – P. 790-791.
317. Levinson, W. Medical Microbiology & Immunology: Examination & Board Review / W. Levinson. – The McGraw-Hill Companies, Inc, 2004. – 644 p.
318. Liles, W. C. Review: nomenclature and biologic significance of cytokines involved in inflammation and the host immune response / W. C. Liles, W. C. Van Voorhis // J. Infect. Dis. – 1995. – Vol. 172, № 6. – P. 1573–1580.
319. Lin, P. L. Understanding latent tuberculosis: a moving target / P. L. Lin, J. L. Flynn // J. Immunol. – 2010. – Vol. 185, № 1. – P. 15–22.
320. Lipidated promiscuous peptides vaccine for tuberculosis-endemic regions / U. Gowthaman [et al.] // Trends Mol. Med. – 2012. – Vol. 18, № 10. – P. 607–614.

321. Liu, C. H. Innate immunity in tuberculosis: host defense vs pathogen evasion / C. H. Liu, H. Liu, B. Ge // *Cell Mol. Immunol.* – 2017. – Vol. 14, № 12. – P. 963-975.
322. Lobue, P. Treatment of latent tuberculosis infection: an update / P. Lobue, D. Menzies // *Respirology.* – 2010. – Vol. 15. – P. 603–622.
323. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti* / A. S. Pym [et al.] // *Mol. Microbiol.* – 2002. – Vol. 46, № 3. – P. 709–717.
324. LTBI: latent tuberculosis infection or lasting immune responses to *M. tuberculosis*? A TBNET consensus statement / U. Mack [et al.] // *Eur. Respir. J.* – 2009. – Vol. 33, № 5. – P. 956–973.
325. Lyadova, I. V. Th1 and Th17 cells in tuberculosis: protection, pathology, and biomarkers. / I. V. Lyadova, A. V. Panteleev // *Mediators Inflamm.* – 2015. – P. 854507. – doi: 10.1155/2015/854507.
326. Maartens, G. Tuberculosis / G. Maartens, R. J. Wilkinson // *Lancet.* – 2007. – Vol. 370, № 9604. – P. 2030–2043.
327. Mackay, C. R. Chemokine receptors and T cell chemotaxis / C. R. Mackay // *J. Exp. Med.* – 1996. – Vol. 184. – P. 799–802.
328. Macrophage immunoregulatory pathways in tuberculosis / M. V. S. Rajaram [et al.] // *Sem. Immunol.* – 2014. – Vol. 26, № 6. – P. 471-485.
329. Macrophages exposed to *Mycobacterium tuberculosis* release chemokines able to recruit selected leucocyte subpopulations: focus on gamma delta cells / E. Ferrero [et al.] // *Immunology.* – 2003. – Vol. 108, № 3. – P. 365-374.
330. Madariaga, M. G. Clinical utility of interferon gamma assay in the diagnosis of tuberculosis / M. G. Madariaga, Z. Jalali, S. Swindells // *J. Am. Board Family Med.* – 2007. – Vol. 20, № 6. – P. 540–547.
331. Mansbach, A. L. Control of recurrent ENT infections in children / A. L. Mansbach // *Rev. Med. Brux.* – 1994. – Vol. 15, № 4. – P. 198-201.

332. Mapping immune reactivity toward Rv2653 and Rv2654: two novel low-molecular-mass antigens found specifically in the *Mycobacterium tuberculosis* complex / C. Aagaard [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 2004. – Vol. 189. – P. 812–819.
333. Marcos, A. Changes in the immune system are conditioned by nutrition / A. Marcos, E. Nova, A. Montero // *Eur. J. Clin. Nutr.* – 2003. – Vol. 57, suppl. 1. – P. S66–S69.
334. Maternal cocaine administration in mice alters DNA methylation and gene expression in hippocampal neurons of neonatal and prepubertal offspring / S. I. Novikova [et al.] // *PLoS ONE*. – 2008. – Vol. 3, № 4. – e1919.
335. McClean, C. M. Macrophages form, function and phenotype in mycobacterial infection: lessons from tuberculosis and other diseases / C. M. McClean, D. M. Tobin // *Pathog. Dis.* – 2016. – Vol. 74. – P. 1–15. – doi: 10.1093/femspd/ftw068.
336. Mechanisms of control of *Mycobacterium tuberculosis* by NK cells: role of glutathione / M. Allen [et al.] // *Front Immunol.* – 2015. – Vol. 6. – P. 508. – doi: 10.3389/fimmu.2015.00508.
337. Medzhitov, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response / R. Medzhitov // *Nature*. – 2007. – Vol. 449. – P. 819–26. – doi: 10.1038/nature06246.
338. Menzies, D. Meta-analysis: new tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendations for research / D. Menzies, M. Pai, G. Comstock // *Ann. Intern. Med.* – 2007. – Vol. 146. – P. 340–354.
339. Mice that overexpress CC chemokine ligand 2 in their lungs show increased protective immunity to infection with *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin / O. Schreiber [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 2008. – Vol. 198, № 7. – P. 1044–1054.
340. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis* / G. G. Mahairas [et al.] // *J. Bacteriol.* – 1996. – Vol. 178, № 5. – P. 1274–1282.

341. Moser, M. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development / M. Moser, K. M. Murphy // Nat. Immunol. – 2000. – № 1. – P. 199–205.
342. Multifunctional CD4(+) T cells correlate with active *Mycobacterium tuberculosis* infection / N. Caccamo [et al.] // Eur. J. Immunol. – 2010. – Vol. 40, № 8. – P. 2211–2220.
343. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major* / P. A. Darrah [et al.] // Nat. Med. – 2007. – Vol. 13. – P. 843–850.
344. Mustafa, A. S. Development of new vaccines and diagnostic reagents against tuberculosis / A. S. Mustafa // Mol. Immunol. – 2002. – Vol. 39. – P. 113–119.
345. Mustafa, A. S. Identification of *Mycobacterium tuberculosis*-specific genomic regions encoding antigens inducing protective cellular immune responses / A. S. Mustafa, R. Al-Attiah // Indian J. Exp. Biol. – 2009. – Vol. 47, № 6. – P. 498–504.
346. Mustafa, A. S. In silico analysis and experimental validation of *Mycobacterium tuberculosis* -specific proteins and peptides of *Mycobacterium tuberculosis* for immunological diagnosis and vaccine development / A. S. Mustafa // Med. Princ. Pract. – 2013. – Vol. 22, suppl. 1. – P. 43–51.
347. Mustafa, A. S. ProPred analysis and experimental evaluation of promiscuous T-cell epitopes of three major secreted antigens of *Mycobacterium tuberculosis* / A. S. Mustafa, F. A. Shaban // Tuberculosis. – 2006. – Vol. 86, № 2. – P. 115.
348. Mustafa, A. S. Recombinant and synthetic peptides to identify *Mycobacterium tuberculosis* antigens and epitopes of diagnostic and vaccine relevance / A. S. Mustafa // Tuberculosis. – 2005. – Vol. 85, № 5/6. – P. 367–376.
349. Mycobacteria-derived biomarkers for tuberculosis diagnosis / M. Druszczyńska [et al.] // Indian J. Med. Res – 2017. – Vol. 146. – P. 700–707.

350. Mycobacterial antigen 85 complex (Ag85) as a target for ficolins and mannose-binding lectin / A. S. Świerzko [et al.] // Int. J. Med. Microbiol. – 2016. – Vol. 306. – P. 212-21.
351. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin secreting active cathepsin S stimulates expression of mature MHC class II molecules and antigen presentation in human macrophages / H. Soualhia [et al.] // J. Immunol. – 2007. – Vol. 179. – P. 5137–5145.
352. *Mycobacterium bovis* BCG disrupts the interaction of Rab7 with RILP contributing to inhibition of phagosome maturation / J. Sun [et al.] // J. Leukoc. Biol. – 2007. – Vol. 82. – P. 1437-1445.
353. *Mycobacterium tuberculosis* gene expression profiling within the context of protein networks / H. Rachman [et al.] // Microbes Infect. – 2006. – Vol. 8. – P. 747-757.
354. *Mycobacterium tuberculosis* induces high production of nitric oxide in coordination with production of tumour necrosis factor- α in patients with fresh active tuberculosis but not in MDR tuberculosis / S. Sharma [et al.] // Immunol. Cell Biol. – 2004. – Vol. 82. – P. 377–382.
355. *Mycobacterium tuberculosis* latent antigen rv2029c from the multistage DNA vaccine A39 drives th1 responses via TLR-mediated macrophage activation [Electronic resource] / H. Su [et al.] // Front. Microbiol. – 2017. – Vol. 8. – DOI: 10.3389/fmicb.2017.02266.
356. *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10) / F. X. Berthet [et al.] // Microbiology. – 1998. – Vol. 144. – P. 3195-203.
357. *Mycobacterium tuberculosis* promotes apoptosis in human neutrophils by activating caspase-3 and altering expression of Bax/Bcl-xL via an oxygen-dependent pathway / N. Perskvist [et al.] // J. Immunol. – 2002. – Vol. 168, № 12. – P. 6358–65. – doi: 10.4049/jimmunol.168.12.6358.

358. *Mycobacterium tuberculosis* Rv0577, a novel TLR2 agonist, induces maturation of dendritic cells and drives Th1 immune response / E.-H. Byun [et al.] // FASEB J. – 2012. – Vol. 26, № 6. – P. 2695–2711.
359. Neopterin as an index of immune response in patients with tuberculosis / D. Fuchs [et al.] // Lung. – 1984. – Vol. 162. – P. 337–46.
360. Novel and improved technologies for tuberculosis diagnosis: progress and challenges / M. Pai [et al.] // Clin. Chest. Med. – 2009. – Vol. 30, № 4. – P. 701–716.
361. Okada, M. Frontier of mycobacterium research--host vs. mycobacterium / M. Okada, T. Shirakawa // Kekkaku. – 2005. – Vol. 80, № 9. – P. 613-629.
362. Oliver, J. D. The viable but nonculturable state in bacteria / J. D. Oliver // J. Microbiol. – 2005. – Vol. 43. – P. 93-100.
363. Ottenhoff, T. H. Vaccines against tuberculosis: where are we and where do we need to go? / T. H. Ottenhoff, S. H. Kaufmann // PLoS Pathog. 2012. – Vol. 8. – e1002607.
364. Outdoor air pollution and acute respiratory infections among children in developing countries / I. Romieu [et al.] // J. Occup. Environ. Med. – 2002. – Vol. 44. – P. 640–649.
365. Pachange, S. An ensemble classifier approach for disease diagnosis using Random Forest [Electronic resource] / S. Pachange, B. Joglekar, P. Kulkarni // India Conference (INDICON), 2015 Annual IEEE. – URL: <http://ieeexplore.ieee.org/document/7443826/>.
366. Pai, M. Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update / M. Pai, A. Zwerling, D. Menzies // Ann. Intern. Med. – 2008. – Vol. 149, № 3. – P. 177–184.
367. Pan-Hammarstrom, Q. Class switch recombination: a comparison between mouse and human / Q. Pan-Hammarstrom, Y. Zhao, L. Hammarstrom // Adv. Immunol. 2007. – Vol. 93. – P. 1– 61.

368. PCR-based method to differentiate the subspecies of *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis genomic deletions / R. C. Huard [et al.] // Clin. Microbiol. – 2003. – Vol. 41. – P. 1637-1650.
369. Pereira, C. B. Interferon- γ -Receptor deficiency in an infant with fatal bacilli Calmette-Guerin infection / C. B. Pereira, M. Palaci, O. H. Leite // Microb. Infect. – 2004. – Vol. 6. – P. 25-33.
370. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans / B. T. Heijmans [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2008. – Vol. 105, № 44. – P. 17046–17049.
371. Phenotypic classification of human CD4⁺ T cell subsets and their differentiation / R. Okada [et al.] // Int. Immunol. – 2008. – Vol. 20, № 9. – P. 1189-1199.
372. Physiology of mycobacteria / G. M. Cook [et al.] // Adv. Microb. Physiol. – 2009. – Vol. 55. – P. 81-182, 318-189.
373. Pinto, L. M. Immunodiagnosis of tuberculosis: state of the art / L. M. Pinto, J. Grenier, S. G. Schumacher // Med. Princ. Pract. – 2012. – № 21. – P. 4-13.
374. Poirier, L. A. Methyl group deficiency in hepatocarcinogenesis / L. A. Poirier // Drug Metab. Rev. – 1994. – Vol. 26, № 1–2. – P. 185–199.
375. Potential role for ESAT6 in dissemination of *M. tuberculosis* via human lung epithelial cells / A. G. Kinshikar [et al.] // Mol. Microbiol. – 2010. – Vol. 75, № 1. – P. 92-106.
376. PPE protein (Rv3873) from DNA segment RD1 of *Mycobacterium tuberculosis*: strong recognition of both specific T-Cell epitopes and epitopes conserved within the PPE family / L. M. Okkels [et al.] // Infect. Immunity. – 2003. – Vol. 71, № 11. – P. 6116–6123.
377. Prasad, S. Unhealthy smokers: scopes for prophylactic intervention and clinical treatment / S. Prasad, M. A. Kaisar, L. Cucullo // BMC Neurosci. – 2017. – Vol. 18, № 1. – P. 70.

378. Predicting the physiological relevance of in vitro cancer preventive activities of phytochemicals / L. M. Howells [et al.] // *Acta Pharmacol. Sin.* – 2007. – Vol. 28, № 9. – P. 1274–1304.
379. Probing host pathogen cross-talk by transcriptional profiling of both *Mycobacterium tuberculosis* and infected human dendritic cells and macrophages / L. Tailleux [et al.] // *PLoS One*. – 2008. – Vol. 3. – e1403.
380. Progression from latent infection to active disease in dynamic tuberculosis transmission models: a systematic review of the validity of modelling assumptions [Electronic resource] / N. A. Menzies [et al.] // *Lancet Infect. Dis.* – 2018. – DOI: 10.1016/S1473-3099(18)30134-8.
381. Protective CD4 T cells targeting cryptic epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* resist infection-driven terminal differentiation / J. S. Woodworth [et al.] // *J. Immunol.* – 2014. – Vol. 192, № 7. – P. 3247-3258.
382. Purification and characterization of a low-molecularmass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis* / A. L. Sorensen [et al.] // *Infect Immun.* – 1995. – Vol. 63. – P. 1710-1717.
383. Quantifying limits on replication, death, and quiescence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice / M. M. McDaniel [et al.] // *Front. Microbiol.* – 2016. – Vol. 7. – P. 862.
384. Quantitative comparison of active and latent tuberculosis in the cynomolgus macaque model / P. L. Lin [et al.] // *Infect. Immunity.* – 2009. – Vol. 77, № 10. – P. 4631-4642.
385. Quesniaux, V. Toll like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria / V. Quesniaux, C. Fremond, M. Jacobs // *Microbes Infect.* – 2004. – Vol. 6. – P. 946-959.
386. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv / J. C. Camus [et al.] // *Microbiology.* – 2002. – Vol. 148. – P. 2967–2973.

387. Recognition of stage-specific mycobacterial antigens differentiates between acute and latent infections with *Mycobacterium tuberculosis* / A. Demissie [et al.] // Clin. Vaccine Immunol. – 2006. – Vol. 13, № 2. – P. 179-186.
388. Recommendations for investigating contacts of persons with infectious tuberculosis in low- and middle-income countries [Electronic resource] / World Health Organization. – Geneva : WHO, 2012. – URL: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/77741/9789241504492_eng.pdf?sequence=1.
389. Regulation of cell wall synthesis and growth / L. G. Dover [et al.] // Curr. Mol. Med. – 2007. – Vol. 7, № 3. – P. 247–276.
390. Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* PE/PPE genes / M. I. Voskuil [et al.] // Tuberculosis (Edinb). – 2004. – Vol. 84. – P. 256-262.
391. Reinforcing the functionality of mononuclear phagocyte system to control tuberculosis / S. Pahari [et al.] // Front. Immunol. – 2018, – Vol. 9. – P. 193.
392. Replication dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* in chronically infected mice / E. J. Muñoz-Elías [et al.] // Infect. Immunity. – 2005. – Vol. 73, № 1. – P. 546-551.
393. Roberts, L. L. *Mycobacterium tuberculosis* infection of human dendritic cells decrease sintegrin expression, adhesion and migration to chemokines / L. L. Roberts, C. M. Robinson // Immunology. – 2014. – Vol. 141. – P. 39–51.
394. Rohde, K. H. *Mycobacterium tuberculosis* invasion of macrophages: linking bacterial gene expression to environmental cues / K. H. Rohde, R. B. Abramovitch, D. G. Russell // Cell Host Microbe. – 2007. – № 2. – P. 352-364.
395. Role of chemokine ligand 2 in the protective response to early murine pulmonary tuberculosis / A. Kipnis [et al.] // Immunology. – 2003. – Vol. 109, № 4. – P. 547-551.
396. Role of interferons in the development of diagnostics, vaccines, and therapy for tuberculosis [Electronic resource] / K. L. Chin [et al.] // J. Immunol. Res. – 2017. – DOI: 10.1155/2017/5212910.

397. Role of interleukin (IL)-1 type 1 receptor in mycobacterial infection / I. Sugawara [et al.] // Microbiol. Immunol. – 2001. – Vol. 45, № 11. – P. 743–50. – doi: 10.1111/j.1348-0421.2001.tb01310.
398. Role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in Th1 (mycobacterial) and Th2 (schistosomal) antigen induced granuloma formation: relationship to local inflammation, Th cell expression, and IL-12 production / S. W. Chensue [et al.] // J. Immunol. – 1996. – Vol. 157, № 10. – P. 4602-4608.
399. Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis / J. T. Belisle [et al.] // Science. – 1997. – Vol. 276, № 5317. – P. 1420–1422.
400. Rosenkrands, I. Assessment of T cell response to novel *Mycobacterium tuberculosis* synthetic overlapping peptides mixtures (Rv2659 and Rv2660) and ESAT-6 in Egyptian patients / I. Rosenkrands, P. Andersen, A. R. Abdel-Ghaffar / Egypt J. Immunol. – 2014. – Vol. 21, № 2. – P. 75-83.
401. Rv3133c/dosR is a transcription factor that mediates the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis* / H. D. Park [et al.] // Mol. Microbiol. – 2003. – Vol. 48. – P. 833-843.
402. Sada, E. An ELISA for the serodiagnosis of tuberculosis using a 30,000-Danative antigen of *Mycobacterium tuberculosis* // E. Sada, L. E. Ferguson, T. M. Daniel // Infect. Dis. – 1990. – Vol. 162. – P. 928–931.
403. Sampson, S. L. Mycobacterial PE/PPE proteins at the host-pathogen interface [Electronic resource] / S. L. Sampson // Clin. Dev. Immunol. – 2011. – DOI: 10.1155/2011/497203.
404. Seder, R. A. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design / R. A. Seder, P. A. Darrah, M. Roederer // Nat. Rev. Immunol. – 2008. – Vol. 8, № 4. – P. 247–258.
405. Segal, A. W. How neutrophils kill microbes / A. W. Segal // Annu. Rev. Immunol. – 2005. – Vol. 23. – P. 197–223. – doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115653.

406. Seibert, F. B. PPD-S was comprised of approximately 92.1% protein, 5.9% polysaccharides and 1.2% nucleic acid / F. B. Seibert, J. T. Glen // *Am. Rev. Tuberc.* – 1941. – Vol. 44. – P. 9–24.
407. Serodiagnostic potential of culture filtrate antigens of *Mycobacterium tuberculosis* / K. M. Samanich [et al.] // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* – 2000. – Vol. 7. – P. 662–668.
408. Sia, J. K. Innate immune defenses in human tuberculosis: an overview of the interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and innate immune cells [Electronic resource] / J. K. Sia, M. Georgieva, J. Rengarajan // *J. Immunol. Res.* – 2015. – DOI: 10.1155/2015/747543.
409. Siegrist, C. A. Neonatal and early life vaccinology / C. A. Siegrist // *Vaccine.* – 2001. – Vol. 19, № 25-26. – P. 3331–3346.
410. Siegrist, C. A. The challenges of vaccine responses in early life: selected examples / C. A. Siegrist // *J. Comp. Pathol.* – 2007. – Vol. 137, suppl. 1. – P. S4–S9.
411. Signaling through NOD-2 and TLR-4 bolsters the T cell priming capability of dendritic cells by inducing autophagy [Electronic resource] / N. Khan [et al.] // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 19084. – DOI: 10.1038/srep19084.
412. Simian immunodeficiency virus-induced changes in T cell cytokine responses in cynomolgus macaques with latent *Mycobacterium tuberculosis* infection are associated with timing of reactivation / J. T. Mattila [et al.] // *J. Immunol.* – 2011. – Vol. 186, № 6. – P. 3527–3537.
413. Singh, K. P. Genetic and epigenetic changes induced by chronic low dose exposure to arsenic of mouse testicular Leydig cells / K. P. Singh, J. W. Dumond // *Int. J. Oncol.* – 2007. – Vol. 30, № 1. – P. 253–260.
414. Skinner, M. K. Environmental signals and transgenerational epigenetics / M. K. Skinner, C. Guerrero-Bosagna // *Epigenomics.* – 2009. – Vol. 1, № 1. – P. 111–117.

415. Smith, I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence / I. Smith // Clin. Microbiol. Rev. – 2003. – Vol.16. – P. 463-496.
416. Starke, J. R. Interferon-gamma release assays for diagnosis of tuberculosis infection and disease in children / J. R. Starke // Pediatrics. – 2014. – Vol. 134, № 6. – P. E1763–E1773.
417. Starke, J. R. Interferon-release assays for the diagnosis of tuberculosis infection in children / J. R. Starke // J. Pediatr. – 2012. – Vol. 161. – P. 581–582.
418. Stenger, S. T cell mediated immunity to *Mycobacterium tuberculosis* / S. Stenger, R. L. Modlin // Curr. Opin.Microbiol. – 1999. – № 2. – P. 89–93.
419. Stokes, R. W. Adjusting to a new home: *Mycobacterium tuberculosis* gene expression in response to an intracellular lifestyle / R. W. Stokes, S. J. Waddel // Future Microbiol. – 2009. – Vol. 4. – P. 1317-1335.
420. Suppression of human IL-1beta, IL-2, IFN-gamma, and TNF-alpha production by cigarette smoke extracts / Y. Ouyang [et al.] // J. Allergy Clin. Immunol. – 2000. – Vol. 106, № 2. – P. 280–287.
421. T cells and adaptive immunity to *Mycobacterium tuberculosis* in humans / L. D. Jasenosky [et al.] // Immunol. Rev. – 2015. – № 264, № 1. – P. 74-87.
422. Targeting multiple response regulators of *Mycobacterium tuberculosis* augments the host immune response to infection [Electronic resource] / S. K. Banerjee [et al.] // Scientific Reports. – 2016. – Vol. 6. – P. 25851. – DOI:10.1038/srep25851.
423. T-cell exhaustion in tuberculosis: pitfalls and prospects / N. Khan [et al.] // Crit. Rev. Microbiol. – 2017. – Vol. 43, 2. – P. 133-141.
424. T-cell interferon- release assays for the rapid immunodiagnosis of tuberculosis: clinical utility in high-burden vs. low-burden settings / K. Dheda [et al.] // Curr. Opin. Pulm. Med. – 2009. – Vol. 15, № 3. – P. 188–200.
425. Th1 and Th2 cytokines and IgE levels in identical twins with varying levels of cigarette consumption / W. Cozen [et al.] // J. Clin. Immunol. – 2004. – Vol. 24, № 6. – P. 617–622.

426. The 14,000-molecular-weight antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is related to the alpha-crystallin family of low-molecular-weight heat shock proteins / A. Verbon [et al.] // J. Bacteriol. – 1992. – Vol. 174. – P. 1352-1359.
427. The 16-kDa alpha-crystallin (Acr) protein of *Mycobacterium tuberculosis* is required for growth in macrophages / Y. Yuan [et al.] // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1998. – Vol. 95. – P. 9578-9583.
428. The eradication of tuberculosis infection by isoniazid chemoprophylaxis / V. N. Houk [et al.] // Arch. Environ. Health. – 1968. – Vol. 16, № 1. – P. 46–50.
429. The global tuberculosis epidemic and progress in care, prevention, and research: an overview in year 3 of the End TB era / K. Floyd [et al.] // Lancet Respir. Med. – 2018. – Vol. 6, issue 4. – P. 299–314.
430. The human immune response to tuberculosis and its treatment: a view from the blood / J. M. Cliff [et al.] // Immunol. Rev. – 2015. – Vol. 264, № 1. – P. 88-102.
431. The *Mycobacterium tuberculosis* dosRS two-component system is induced by multiple stresses / S. L. Kendall [et al.] // Tuberculosis (Edinb). – 2004. – Vol. 84. – P. 247-255.
432. The *Mycobacterium tuberculosis* PhoPR two component system regulates genes essential for virulence and complex lipid biosynthesis / S. B. Walters [et al.] // Mol. microbiol. – 2006. – Vol. 60. – P. 312-330.
433. The *Mycobacterium tuberculosis* complex-restricted gene CFP32 encodes an expressed protein that is detectable in tuberculosis patients and is positively correlated with pulmonary interleukin-10 / R. C. Huard [et al.] // Infect. Immun. – 2003. – Vol. 71. – P. 6871-6883.
434. The mycolyltransferase 85A, a putative drug target of *Mycobacterium tuberculosis*: development of a novel assay and quantification of glycolipid-status of the mycobacterial cell wall / A. A. Elamin [et al.] // J. Microbiol. Methods. – 2009. – Vol. 79, № 3. – P. 358–363.
435. The prognosis of latent tuberculosis: can disease be predicted? / P. Andersen [et al.] // Trends. Mol. Med. – 2007. – Vol. 13, № 5. – P. 175-182.

436. The pros and cons of the QuantiFERON test for the diagnosis of tuberculosis, prediction of disease progression, and treatment monitoring / E. N. Ndzi [et al.] / Int. J. Micobacteriol. –2016. – Vol. 5, № 2. – P. 177-184.
437. The RD1 locus in the *Mycobacterium tuberculosis* genome contributes to activation of caspase-1 via induction of potassium ion efflux in infected macrophages / T. Kurenuma [et al.] // Infect. Immun. – 2009. – Vol. 77, № 9. – P. 3992–4001. – doi: 10.1128/IAI. 00015-09.
438. The resuscitation-promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis* are required for virulence and resuscitation from dormancy but are collectively dispensable for growth in vitro / B. D. Kana [et al.] // Mol. Microbiol. – 2008. – Vol. 67. – P. 672-684.
439. The spectrum of disease in children treated for tuberculosis in a highly endemic area / B. J. Marais [et al.] // Int. J. Tuberc. Lung Dis. – 2006. – Vol. 10. – P. 732–738.
440. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies / C. E. Barry III [et al.] // Nat. Rev. Microbiol. – 2009. – Vol. 7, № 12. – P. 845–855.
441. The *Mycobacterium bovis* BCG prime-Rv0577 DNA boost vaccination induces a durable Th1 immune response in mice / D. Gu [et al.] // Acta Biochim. Biophys. Sin (Shanghai). – 2016. – Vol. 48, № 4. – P. 385-390.
442. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics / ed. C. A. Burtis, E. R. Ashwood, D. E. Bruns. – 4 ed. – New Delhi : Elsevier, 2006. – 2412 p.
443. TLR2-dependent mast cell activation contributes to the control of *Mycobacterium tuberculosis* infection / D. Carlos [et al.] // Microbes Infect. – 2009. – Vol. 11. – P. 770–778.
444. Tobacco smoking increases immune activation and impairs T-cell function in HIV infected patients on antiretrovirals: a cross-sectional pilot study / R. Valiathan [et al.] // PLoS One. – 2014. – Vol. 9, № 5. – e97698.

445. Toll-Like receptor 2 is required for control of pulmonary infection with *Francisella tularensis* / M. Malik [et al.] // Infect. Immunity. – 2006. – Vol. 74, № 6. – P. 3657-3662.
446. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses / M. Schnare [et al.] // Nat. Immunol. – 2001. – Vol. 2, № 10. – P. 947–950.
447. Topham, N. J. Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger? / N. J. Topham, E. W. Hewitt // Immunology. – 2009. – № 1. – P. 7–15.
448. Tracking universal health coverage. First global monitoring report [Electronic resource] / World Health Organization, The World Bank. – Geneva : WHO, 2015. – URL: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/174536/9789241564977_eng.pdf.
449. Transcriptional Adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within Macrophages: insights into the phagosomal environment / D. Schnappinger [et al.] // J. Exp. Med. – 2003. – Vol. 198. – P. 693-704.
450. Transgenerational effects of prenatal nutrient restriction on cardiovascular and hypothalamic-pituitary-adrenal function / C. Bertram [et al.] // J. Physiol. – 2008. – Vol. 586, № 8. – P. 2217–2229.
451. Travar, M. Type I, II, and III interferons: regulating immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection / M. Travar, M. Petkovic, A. Verhaz // Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz). – 2016. – Vol. 64, № 1. – P. 19-31. – doi: 10.1007/s00005-015-0365-7.
452. Treatment of latent tuberculosis infection in HIV infected persons [Electronic resource] / C. Akolo [et al.] // Cochrane Database Syst Rev. – 2010. – Vol. 20, issue 1. – CD000171.
453. Triggering through Toll-like receptor 2 limits chronically stimulated T-helper type 1 cells from undergoing exhaustion / S. B. Chodisetti [et al.] // J. Infect. Dis. – 2015. Vol. 211. – P. 486–496.
454. Trunz, B. B. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of

- cost-effectiveness / B. B. Trunz, P. Fine, C. Dye // *Lancet*. – 2006. – Vol. 367, № 9517. – P. 1173–1180.
455. Tuberculin reactivity after newborn BCG immunization in mono- and dizygotic twins / R. L. Sepulveda [et al.] // *Tuber. Lung Dis.* – 1994. – Vol. 75. – P. 138–143.
456. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent / J. Keane [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2001. – Vol. 345, № 15. – P. 1098–104.
457. Tuberculosis disease diagnosis using artificial immune recognition system. / S. Shahaboddin [et al.] // *Int. J. Med. Sci.* – 2014. – Vol. 11, № 5. – P. 508e14.
458. Tuberculosis fact sheet, 2017 [Electronic resousce] / World Health Organization. – URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>. – [Access date: 18.05.18].
459. Tuberculosis genes expressed during persistence and reactivation in the resistant rabbit model / A. K. Kesavan [et al.] // *Tuberculosis*. – 2009. – Vol. 89. – P. 17-21.
460. Tuberculosis immunology in children: diagnostic and therapeutic challenges and opportunities / D. A. Lewinsohn [et al.] // *Int. J. Tuberc. Ling. Dis.* – 2004. – Vol. 8, № 5. – P.658-674.
461. Tuberculosis in children and adults: two distinct genetic diseases / A. Alcaïs [et al.] // *J. Experim. Med.* – 2005. – Vol. 202, № 12. – P. 1617-1621.
462. Tuberculosis subunit vaccination provides long-term protective immunity characterized by multifunctional CD4 memory T cells / T. Lindenstrom [et al.] // *J. Immunol.* – 2009. – Vol. 182. – P. 8047–8055.
463. Tumor necrosis factor neutralization results in disseminated disease in acute and latent *Mycobacterium tuberculosis* infection with normal granuloma structure in a cynomolgus macaque model / P. L. Lin [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2010. – Vol. 62, № 2. – P. 340–350.
464. Type I interferons mediate the innate cytokine response to recombinant Fowlpox virus but not the induction of plasmacytoid dendritic cell-dependent

- adaptive immunity / E. L. Lousberg [et al.] // *Journal of Virology*. – 2010. – Vol. 84, № 13. – P. 6549–6563. – doi: 10.1128/JVI.02618-09.
465. Ulrichs, T. New insights into the function of granulomas in human tuberculosis / T. Ulrichs, S. H. Kaufmann // *J. Pathol.* – 2006. – Vol. 208. – P. 261-269.
466. Understanding delayed T-cell priming, lung recruitment, and airway luminal T-cell responses in host defense against pulmonary tuberculosis [Electronic resource] / C. R. Shaler [et al.] // *Clin. Dev. Immunol.* – 2012. – DOI: 10.1155/2012/628293.
467. Update on tuberculosis biomarkers: from correlates of risk, to correlates of active disease and of cure from disease / D. Goletti [et al.] // *Respirology*. – 2018. – Vol. 23, № 5. – P. 455-466.
468. Using the TB_{Ag}/PHA ratio in the T-SPOT(®).TB assay to distinguish TB disease from LTBI in an endemic area / F. Wang [et al.] // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* – 2016. – Vol. 20, № 4. – P. 487-493.
469. van Crevel, R. Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis* / R. Van Crevel, T. H. Ottenhoff, J. W. Van der Meer // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2002. – Vol. 15. – P. 294-309.
470. van den Bergl, T. K. On the origins of adaptive immunity: innate immune receptors join the tale / T. K. van den Bergl, J. A. Yoder, G. W. Litman // *TRENDS Immunol.* – 2004. – Vol. 25, № 1. – P. 11-16.
471. Venturini, E. What steps do we need to take to improve diagnosis of tuberculosis in children? / E. Venturini http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Venturini%20E%5bAuthor%5d&cauthor=true&cauthor_uid=25938981, G. Remaschi http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Remaschi%20G%5bAuthor%5d&cauthor=true&cauthor_uid=25938981, E. Berti // *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* – 2015, Vol. 13, № 7. – P. 907-922.

472. Voskuil, M. I. *Mycobacterium tuberculosis* gene expression during environmental conditions associated with latency / M. I. Voskuil // *Tuberculosis* (Edinb). – 2004. – Vol. 84. – P. 138-143.
473. Walker, V. Does neonatal BCG vaccination protect against tuberculous meningitis? / V. Walker, G. Selby, I. Wacogne // *Arch. Dis. Child.* – 2006. – Vol. 91, № 9. – P. 789–791.
474. Wallis, R. S. Infectious complications of tumor necrosis factor blockade / R. S. Wallis // *Curr. Opin. Infect Dis.* – 2009. – Vol. 22, № 4. – P. 403–409.
475. Wayne, L. G. Nonreplicating persistence of *Mycobacterium tuberculosis* II / L. G. Wayne, C. D. Sohaskey // *Annu Rev. Microbiol.* – 2001. – Vol. 55. – P. 139-163.
476. Weiss, G. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. / G. Weiss, U. E. Schaible // *Immunol. Rev.* – 2015. – Vol. 264, № 1. – P. 182–203. – doi : 10.1111/imr.12266.
477. Whitworth, H. S. Biomarkers of tuberculosis: a research roadmap [Electronic resource] / H. S. Whitworth, E. Aranday-Cortes, Aj. Lalvani // *Biomark. med.* – 2013. – Vol. 7, № 3. – URL: doi.org/10.2217/bmm.13.53.
478. Wiker, H. G. The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis* / H. G. Wiker, M. Harboe // *Microbiol. Rev.* – 1992. – Vol. 56. – P. 648–661.
479. World Health Organization model list of essential in vitro diagnostics [Electronic resource]. – 1-th ed. – 2018. – URL: http://www.who.int/medical_devices/diagnostics/WHO_EDL_2018.pdf?ua=1. – [Access date: 18.05.2018].
480. Yang, H. Purified protein derivatives of tuberculin – past, present, and future / H. Yang, N. A. Kruh-Garcia, K. M. Dobos // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* – 2012. – Vol. 66, № 3. – P. 273-280.
481. Ygberg, S. The developing immune system – from foetus to toddler / S. Ygberg, A. Nilsson // *Acta Paediatr.* – 2012. – Vol. 101. – P. 120 –127.

482. Yoon, S. R. Understanding of molecular mechanisms in natural killer cell therapy [Electronic resource] / S. R. Yoon, T.-D. Kim, I. Choi // *Exp. Mol. Med.* – 2015. – DOI: 10.1038/emm.2014.114.
483. Young, D. B. Eliminating latent tuberculosis / D. B. Young, H. P. Gideon, R. J. Wilkinson // *Trends Microbiol.* – 2009. – Vol. 17, № 5. – P. 183–188.
484. Yuk, J.-M. Host immune responses to mycobacterial antigens and their implications for the development of a vaccine to control tuberculosis / J.-M. Yuk, E.-K. Jo // *Clin. Exp. Vaccine Res.* – 2014. – Vol. 3, № 2. – P. 155-167.
485. Zhang, Y. Persistent and dormant tubercle bacilli and latent tuberculosis / Y. Zhang // *Front Biosci.* – 2004. – Vol. 9. – P. 1136-1156.

ПРИЛОЖЕНИЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Программа № 1

Таблица А.1 – Выявление туберкулезной инфекции у детей (педиатрический этап)

№ п/п	Симптом, признак	Признак есть – 1 иначе - 0	$P(S D_1)$ ЛТИ	$P(S D_2)$ НТО	Шанс для пациентов с ЛТИ	ОП для пациентов с ЛТИ $L(D_1 S)$
S1	возраст ребенка: 6 лет и старше	0	0,4000	0,1667	0,667	2,400
S2	возраст ребенка: до 3-х лет	1	0,5000	0,5000	1,000	1,000
S3	пол: женский	0	0,5333	0,4000	1,143	1,333
S4	курение в семье	1	0,2667	0,3667	0,364	0,727
S5	социально-сохранная семья	1	0,9000	0,8333	9,000	1,080
S6	осложнения беременности у матери	0	0,6333	0,6667	1,727	0,950
S7	выявление патологии при рождении	0	0,6333	0,6667	1,727	0,950
S8	масса тела при рождении до 2500 г	0	0,1000	0,0333	0,111	3,000
S9	грудное вскармливание	1	0,7667	0,7667	3,286	1,000
S10	выявление соматической патологии до 1 года	0	0,7000	0,4667	2,333	1,500
S11	эпизоды ОРВИ до 1 года	0	0,6000	0,2000	1,500	3,000
S12	дефицитные состояния до 1 года	0	0,4667	0,2333	0,875	2,000
S13	вакцинация БЦЖ (БЦЖ-М): р. 4 и > мм	1	0,7333	0,3667	2,750	2,000
S14	проф. прививки по календарю	1	0,3667	0,4333	0,579	0,846
S15	анемия	0	0,0667	0,0500	0,071	1,333
S16	отягощенный аллергологический анамнез	1	0,6333	0,3333	1,727	1,900
S17	аллергические заболевания верхних и нижних дыхательных путей	0	0,2000	0,0500	0,250	4,000
S18	перенесенные детские инфекции	0	0,5333	0,3667	1,143	1,455
S19	группа ЧБД	0	0,4000	0,4000	0,667	1,000
S20	хронические заболевания	0	0,3667	0,1667	0,579	2,200
S21	нарушения физического развития: ДМТ	0	0,1667	0,1333	0,200	1,250
S22	социальная гр. риска по туберкулезу	0	0,1333	0,1667	0,154	0,800
S23	медицинская гр. риска по туберкулезу	0	0,4000	0,4667	0,667	0,857
S24	установленный контакт с больным туберкулезом	0	0,1333	0,0667	0,154	2,000
S25	проба Манту с 2 ТЕ ППД-Л: положительная реакция	1	0,9500	0,3000	19,000	3,167
S26	проба с диаскинтестом: положительная реакция	0	0,1333	0,0500	0,154	2,667
S27	тест in vitro: определение уровня индуцированного ИФН-γ с ППД-Л, и.с.>3,9	1	0,8667	0,1333	6,500	6,500
% ИТОГ - $P(D_1 S_i)$ – вероятность риска ЛТИ у данного пациента при данном симптомокомплексе, %			17,56			

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Программа № 2 (I этап)

Таблица Б.1 – Ранняя диагностика туберкулезной инфекции у детей (фтизиатрический I этап)

№ п/п	Симптом, признак	Признак есть – 1 иначе - 0	P(S D ₁) ЛТИ1	P(S D ₂) ЛТИ2	Шанс для пациентов с РПТИ	ОП для пациентов с РПТИ L(D ₁ S)
S1	возраст ребенка: 6 лет и старше	1	0,4000	0,6667	0,667	0,600
S2	возраст ребенка: до 3-х лет	0	0,5000	0,4000	1,000	1,250
S3	пол: женский	0	0,5333	0,4667	1,143	1,143
S4	курение в семье	1	0,2667	0,2333	0,364	1,143
S5	социально-сохранная семья	1	0,9000	0,7667	9,000	1,174
S6	осложнения беременности у матери	0	0,6333	0,4000	1,727	1,583
S7	выявление патологии при рождении	0	0,6333	0,5333	1,727	1,188
S8	масса тела при рождении до 2500 г	0	0,1000	0,0333	0,111	3,000
S9	грудное вскармливание	0	0,7667	0,7333	3,286	1,045
S10	выявление соматической патологии до 1 года	0	0,7000	0,5000	2,333	1,400
S11	эпизоды ОРВИ до 1 года	1	0,6000	0,3000	1,500	2,000
S12	дефицитные состояния до 1 года	0	0,4667	0,4000	0,875	1,167
S13	вакцинация БЦЖ (БЦЖ-М): р. 4 и > мм	0	0,7333	0,5333	2,750	1,375
S14	проф. прививки по календарю	1	0,3667	0,6667	0,579	0,550
S15	анемия	0	0,0667	0,1000	0,071	0,667
S16	отягощенный аллергологический анамнез	0	0,6333	0,5333	1,727	1,188
S17	аллергические заболевания верхних и нижних дыхательных путей	0	0,2000	0,1667	0,250	1,200
S18	перенесенные детские инфекции	1	0,5333	0,6333	1,143	0,842
S19	группа ЧБД	1	0,4000	0,3333	0,667	1,200
S20	хронические заболевания	0	0,3667	0,2333	0,579	1,571
S21	нарушения физического развития: ДМТ	0	0,1667	0,1000	0,200	1,667
S22	социальная гр. риска по туберкулезу	0	0,1333	0,2333	0,154	0,571
S23	медицинская гр. риска по туберкулезу	0	0,4000	0,2333	0,667	1,714
S24	установленный контакт с больным туберкулезом	0	0,1333	0,0500	0,154	2,667
S25	проба Манту с 2 ТЕ ППД-Л: положительная реакция	1	0,9500	0,9500	19,000	1,000
S26	проба с диаскинтестом: положительная реакция	0	0,1333	0,0333	0,154	4,000
S27	тест in vitro: определение уровня индуцированного ИФН-γ с ППД-Л, и.с.>3,9	1	0,6667	0,3333	2,000	2,000
S28	ИФН-γ с CFP32B, положительный	0	0,5333	0,1333	1,143	4,000
S29	ИФН-γ с Rv2660c, положительный	1	0,8333	0,3000	5,000	2,778
S30	ИФН-γ с ESAT6, положительный	1	0,5333	0,1667	1,143	3,200
S31	ИФН-γ с Ag85a, положительный	1	0,5000	0,0667	1,000	7,500
S32	ИФН-γ с ESAT6-CFP10, положительный	0	0,0667	0,0500	0,071	1,333
% ИТОГ - P(D ₁ S _i) – вероятность риска РПТИ у данного пациента при данном симптомокомплексе, %			44,19			

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Программа № 2 (II этап)

Таблица В.1 – Ранняя диагностика туберкулезной инфекции у детей (фтизиатрический II этап)

№ п/п	Симптом, признак	Признак есть – 1 иначе - 0	P(S D ₁) ТБ0	P(S D ₂) ЛТИ	Шанс для пациентов с ТБ	ОП для пациентов с ТБ L(D ₁ S)
S1	возраст ребенка: 6 лет и старше	1	0,6333	0,4000	1,727	1,583
S2	возраст ребенка: до 3-х лет	0	0,3333	0,5000	0,500	0,667
S3	курение в семье	1	0,4000	0,2667	0,667	1,500
S4	социально-сохранная семья	1	0,2667	0,9000	0,364	0,296
S5	осложнения беременности у матери	0	0,6000	0,6333	1,500	0,947
S6	выявление патологии при рождении	0	0,5000	0,6333	1,000	0,789
S7	масса тела при рождении до 2500 г	0	0,0667	0,1000	0,071	0,667
S8	грудное вскармливание	0	0,5000	0,7667	1,000	0,652
S9	анемия	0	0,1667	0,0667	0,200	2,500
S10	отягощенный аллергологический анамнез	1	0,1333	0,6333	0,154	0,211
S11	аллергические заболевания верхних и нижних дыхательных путей	0	0,0500	0,2000	0,053	0,250
S12	хронические заболевания	0	0,1667	0,3667	0,200	0,455
S13	нарушения физического развития: ДМТ	0	0,2333	0,1667	0,304	1,400
S14	социальная гр. риска по туберкулезу	0	0,7586	0,1333	3,143	5,690
S15	медицинская гр. риска по туберкулезу	1	0,1034	0,4000	0,115	0,259
S16	установленный контакт с больным туберкулезом	0	0,7667	0,1333	3,286	5,750
S17	группа риска по результатам туберкулинодиагностики	1	0,9000	0,9500	9,000	0,947
S18	проба Манту с 2 ТЕ ППД-Л: положительная реакция	1	0,9333	0,9500	14,000	0,982
S19	проба с диаскинтестом: положительная реакция	1	0,9333	0,1333	14,000	7,000
S20	тест in vitro: определение уровня индуцированного ИФН-γ с ППД-Л, и.с.>3,9	1	0,7333	0,2667	2,750	2,750
S21	ИФН-γ с CFP32B, и.с.>0,4	0	0,4333	0,6000	0,765	0,722
S22	ИФН-γ с Rv2660c, и.с.>1,0	0	0,3000	0,7333	0,429	0,409
S23	ИФН-γ с ESAT6, и.с.>0,35	0	0,3333	0,6667	0,500	0,500
S24	ИФН-γ с Ag85a, и.с.>0,3	1	0,3000	0,7333	0,429	0,409
S25	ИФН-γ с ESAT6-CFP10, и.с.>0,2	1	0,9333	0,0667	14,000	14,000
S26	IFNG, T-1488C, TT	0	0,2000	0,6333	0,250	0,316
S27	IFNG, T-1488C, CC	0	0,1667	0,1667	0,200	1,000
S28	IFNG, T-1488C, TC	1	0,6333	0,2000	1,727	3,167
S29	MCPI, C-2508T, TT	1	0,4667	0,6333	0,875	0,737
S30	MCPI, C-2508T, CC	0	0,0667	0,0333	0,071	2,000
S31	MCPI, C-2508T, TC	0	0,4667	0,3333	0,875	1,400
% ИТОГ - P(D1 Si) – вероятность риска ТБ у данного пациента при данном симптомокомплексе, %			71,97			