

КВАНТИФЕРОНОВЫЙ ТЕСТ – ИНОВАЦИОННЫЙ МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА

Горецкая М.В.

Гродненский государственный медицинский университет, Беларусь
Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии им. С. И. Гельберга

Актуальность. На фоне иммуносупрессии в организме человека отмечается реактивации латентной инфекции *Mycobacterium tuberculosis* с развитием туберкулеза. Для пациентов, получающих терапию ингибиторами TNF- α (например, инфликсимаб), этот риск увеличивается в 5-10 раз по сравнению с небиологическими методами лечения в тех же популяционных группах. Употребление инфликсимаба повышает риск развития туберкулеза у пациентов с ревматоидным артритом с 6,2 до 52,5 случаев на 100 тысяч пациентов. Так, например, в Южнокорейской популяции – с 8,9 до 30 случаев, а у французских пациентов, получавших лечение инфликсимабом, туберкулез был зарегистрирован у 187,5 в расчете на 100 тыс. пациентов. Эта частота значительно превышает фоновые показатели [5]. Инфликсимаб – соединение, созданное на основе гибридных мышиных и человеческих IgG₁ моноклональных антител, обладает высоким аффинитетом к TNF- α и является селективным иммунодепрессантом. Инфликсимаб быстро связывается с TNF- α и образует устойчивые соединения. В результате блокируется функциональная активность TNF- α [1-4].

Причина снижения противотуберкулезного иммунитета инфликсимабом связана со способностью инфликсимаба лизировать клетки, содержащие TNF- α на своей поверхности. Это относится и к клеткам гранулем, формирующихся вокруг *Mycobacterium tuberculosis*. Соединяясь с молекулами TNF- α на поверхности клеток гранулемы, инфликсимаб вызывает гибель этих клеток посредством апоптоза. Целостность гранулемы нарушается, и она перестает выполнять роль ограничения инфекции [5]. В связи с этим, в США в инструкцию по применению инфликсимаба внесена официальная рекомендация проводить предварительную диагностику пациентов на наличие туберкулеза.

Новые подходы к диагностике латентного и активного туберкулеза основаны на определении количества клеток, продуцирующих IFN- γ или количества IFN- γ , продуцируемого клетками периферической крови после их стимуляции антигенами *M. tuberculosis*. Квантифероновый тест (QFT) – новый иммунологический метод диагностики туберкулеза. В крови лиц, инфицированных *M. tuberculosis*, содержат-

ся лимфоциты, распознающие микобактериальные антигены. Процесс распознавания влечет за собой продуцирование и секрецию IFN- γ . Данный тест основан на обнаружении и последующем количественном анализе IFN- γ .

QFT, несмотря на высокую специфичность, в Беларуси еще не имеет широкого применения, поскольку тест дорогостоящий и для проведения требуется специализированное лабораторное оснащение, а также квалифицированный персонал. Встречаются единичные публикации об использовании данного теста в Минске. Однако по Гродно и по всей гродненской области нет информации о применении квантиферонового теста.

Цель. Оценить возможность использования квантиферонового теста для диагностики туберкулеза в Гродно.

Метод QFT использует твердофазный иммуносорбентный анализ для измерения антигенспецифической продукции IFN- γ Т-лимфоцитами крови. Для активации используют смесь белков ESAT-6, CFP-10 и TB7.7, специфических для *M. tuberculosis*. Эти белки стимулируют IFN- γ Т-клеточный ответ у людей, инфицированных *M. tuberculosis*, но не вызывают такой ответа у неинфицированных людей или людей, прошедших BCG-вакцинацию. Продолжительность метода составляет около 27 часов, включая инкубации, а также манипуляции с планшетом (выполнения основного исследования). Один планшет позволяет обработать материал 28 пациентов.

Кровь пациента отбирается в три специальные пробирки, входящие в состав набора QFT: контрольная пробирка, пробирка с антигенами *M. tuberculosis* и пробирка с митогеном фитогемагглютинином (ФГА). При постановке теста QFT пробирку с митогеном ФГА используют в качестве положительного контроля. Это особенно важно, если есть сомнения относительно иммунного статуса пациента. Нулевая проба (контрольная пробирка) охватывает коррекцию неспецифических фоновых реакций, эффектов гетерофильных антител, а также неспецифического IFN- γ в пробе крови. Следует отметить, что кровь можно отобрать и в одну отдельную пробирку с гепарином, а затем перенести кровь в специальные пробирки набора QFT. В исследовании необходимо использовать только гепарин, так как другие антикоагулянты оказывают влияние на результаты анализа. Минимальный объем крови, требуемый для проведения реакции, составляет 5 мл. Пробирки должны быть помещены в термостат с 37°C не позднее 16 часов с момента забора крови. Перед инкубацией пробы должны находиться при комнатной температуре. Не следует образцы крови помещать в холодильник и замораживать.

Пробирки необходимо инкубировать в вертикальном положении при 37°C в течение 16-24 часов. После инкубации перед центрифугированием допускается хранить их при температуре от 4°C до 27°C в течение трех дней. После центрифугирования образцы плазмы необходимо загружать непосредственно на планшеты QFT для выполнения реакции. Однако следует отметить, что образцы плазмы допускается хранить до 28 дней в холодильнике (2-8°C). В замороженном виде при температуре ниже минус 20°C плазму можно хранить в течение более продолжительного времени. Для получения необходимого количества образца для теста требуется отобрать не менее 200 мкл плазмы.

На шейкере для микропланшетов следует тщательно перемешать конъюгат, образцы плазмы, а также стандарты. Планшеты инкубируют при комнатной температуре в течение 2 часов. На протяжении этого времени планшет должен быть накрыт крышкой, и не подвергаться воздействию прямых солнечных лучей. По истечению времени инкубации следует промыть каждую лунку 96-луночного планшета буферным раствором не менее шести раз. Далее в лунки добавляют раствор ферментного субстрата и перемешивают на шейкере. Инкубируют 30 минут при комнатной температуре. После чего реакцию останавливают добавлением стоп-раствора.

Оптическую плотность (ОП) лунок планшета определяют в течение пяти минут после добавления стоп-реагента. Для этого используют ридер для микропланшетов с фильтром 450 нм и референсным фильтром 620-650 нм. Значения ОП используют для расчета результатов. Определяют среднее значение ОП дубликатов рабочих стандартов на каждом планшете. Необходимо построить стандартную кривую $\log(e)$ – $\log(e)$, по оси y наносят $\log(e)$ средних ОП, а по оси x – $\log(e)$ концентрации IFN- γ в стандартах в МЕ/мл, исключив из этих расчетов нулевой стандарт. Методом регрессионного анализа рассчитывают максимально соответствующую стандартной кривой линию. С помощью стандартной кривой для каждого исследуемого образца плазмы теста определяют концентрацию IFN- γ (в МЕ/мл), используя значение ОП для каждого образца. Точность результатов теста зависит от получения стандартной кривой. Значение IFN- γ нулевой пробирки отнимается от значения IFN- γ пробирки с антигенами *M. tuberculosis* и пробирки с митогеном ФГА. Результат считается положительным (ответ IFN- γ на стимуляцию), если концентрация IFN- γ в пробирке с антигенами *M. tuberculosis* значительно выше концентрации в нулевой контрольной пробирке.

Положительный результат теста – одно из доказательств наличия *M. tuberculosis* в организме, однако человек может быть инфицирован

и другими микобактериями (например, *M. kansasii*, или *M. szulgai*, или *M. marinum*), так как у них присутствуют гены, в которых закодированы белки ESAT-6, CFP-10 и TB7.7, что также приведет к положительному результату. Поэтому необходимы дополнительные исследования, чтобы подтвердить или исключить наличие инфекции.

В настоящее время нет сомнений в том, что при использовании инфликсимаба существует определенный риск развития туберкулеза или обострения его латентных форм. Опасность реактивации латентного туберкулеза возникает при общем угнетении активности TNF- α более чем на 70-90% [5]. Использование квантиферонового метода у пациентов с иммуносупрессией достаточно перспективно, поскольку в мировой практике показало хорошие результаты (частота получения неопределенных результатов составила всего около 10%).

Выводы. Внедрение квантиферонового метода исследования позволит повысить качество диагностики туберкулеза, особенно на фоне иммуносупрессии.

Для проведения нового квантиферонового теста в Гродно имеются все необходимые условия.

Литература

1. Горецкая, М.В. Влияние инфликсимаба на содержание аминокислот в лимфоцитах крови на фоне алкогольной интоксикации / Горецкая М.В., Шейбак В.М., Дорошенко Е.М., Кирвель П.Ч. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2012. – № 12. – С. 30-33.
2. Горецкая, М.В. Антитела к фактору некроза опухоли альфа изменяют метаболическую активность в лимфоцитах тимуса на фоне алкогольной интоксикации / Горецкая М.В. // Иммунология. – 2013. – № 1. – С. 31-34.
3. Горецкая, М.В. Моноклональные антитела к фактору некроза опухоли альфа изменяют метаболическую активность в лимфоцитах на фоне хронического потребления этанола / Горецкая М.В., Шейбак В.М. // Биомедицинская химия. – 2013. – № 4. – С. 425-433.
4. Кирвель, П.Ч. Гепатопротекторный и иммуномодулирующий эффекты инфликсимаба при экспериментальном алкогольном стеатогепатите / Кирвель П.Ч., Горецкая М.В., Лукивская О.Я., Нарута Е.Е., Белоновска Е.Б., Буко В.У. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2012. – № 7. – С. 36-39.
5. Лукина, Г.В. Риск развития туберкулеза при использовании ингибиторов фактора некроза опухоли- α / Г.В. Лукина, Я.А. Сигидин // РМЖ. – 2009. – № 21, Т. 17. – С. 1438-1442.