

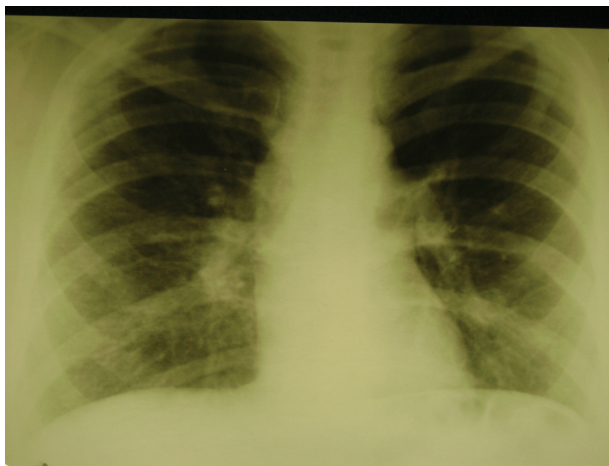


Рис. 2. Обзорная рентгенограмма легких больной И. после курса экстракорпоральных методов лечения и лечебного голодания

гемограммы, отмечался прирост по данным ФВД. У пациентки значительно уменьшилась одышка, нормализовалась температура, исчезло ощущение дискомфорта за грудиной.

Заключение. Данным примером мы показали возможность применения альтернативных методов лечения у пациентов с впервые выявленным саркоидозом, сопутствующими заболеваниями и невозможностью применения адекватных доз системных ГКС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sarcoidosis // Eur. Radiol. — 2005. — Vol. 15. — P. 23—30.
2. Kreit, J.W. Hemoptysis / J.W. Kreit // Clinical Respiratory Medicine. — 2004. — Mosby. — P. 249—255.
3. Lachkar, S. Aspergillosis and sarcoidosis / S. Lachkar, S. Dominique, L. Thiberville [et al.] // Rev. Mal. Respir. — 2007. — Vol. 24, № 8. — P. 943—953.
4. Schreiber, J. Differential diagnosis of diffuse pulmonary haemorrhage / J. Schreiber, J. Knolle, R. Kachel, R. Schuck // Pneumologie. — 2006. — Vol. 60, № 6. — P. 347—354.

© Н.В. Макарова, С.Е. Борисов, М.А. Владимирский, Т.Н. Власик, 2010

УДК [616-002.582-002.5+616.24]:612.017.1

АНТИГЕНИНДУЦИРОВАННЫЙ ИНТЕРФЕРОН ГАММА ПРИ САРКОИДОЗЕ, ТУБЕРКУЛЕЗЕ И НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЛЕГКИХ

НАТАЛЬЯ ВЛАДИМИРОВНА МАКАРОВА, канд. мед. наук, врач-пульмонолог Клиники фтизиопульмонологии Московского медицинского университета им. И.М. Сеченова Росздрава, Москва (8-495-688-27-78, e-mail: ntyke@mail.ru)

СЕРГЕЙ ЕВГЕНЬЕВИЧ БОРИСОВ, докт. мед. наук, профессор, заместитель директора по научно-клинической работе Московского городского научно-практического центра борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы (8-499-268-50-10, e-mail: barsik@online.ru)

МИХАИЛ АЛЕКСАНДРОВИЧ ВЛАДИМИРСКИЙ, докт. мед. наук, профессор, заведующий лабораторным отделом НИИ фтизиопульмонологии Московского медицинского университета им. И.М. Сеченова Росздрава, Москва (8-917-541-62-38)

ТАТЬЯНА НИКОЛАЕВНА ВЛАСИК, канд. биол. наук, руководитель лаборатории клеточной инженерии Российского кардиологического научно-производственного комплекса Росмедтехнологий, Москва (8-495-414-69-54)

Реферат. Исследована концентрация ИФН- γ в образцах крови, полученных от 67 больных саркоидозом, 60 — туберкулезом и 44 — неспецифическими воспалительными заболеваниями легких. Средние значения концентрации (пг/мл) ИФН- γ после 24 ч инкубирования с PPD при туберкулезе ($302,1 \pm 32,6$; 95% ДИ 236,9—367,4) были достоверно выше, чем при саркоидозе ($66,7 \pm 16,8$; 95% ДИ 33,2—100,2). При воздействии ESAT-6 показатели при саркоидозе были минимальны ($9,2 \pm 2,98$; 95% ДИ 3,3—15,2), достоверно отличаясь от таковых при туберкулезе ($92,8 \pm 16,7$; 95% ДИ 59,3—126,3) и НЗВЛ ($95,2 \pm 29,4$; 95% ДИ 35,9—154,4). При пороговой концентрации 70 пг/мл (как при использовании в качестве антигена-индуктора PPD, так и ESAT-6) диагностическая эффективность теста для различения саркоидоза и туберкулеза составила 77,9%, чувствительность — 76,1%, специфичность — 80%. При концентрации ИФН- γ менее 70 пг/мл шансы на наличие у больного саркоидоза выше, чем на наличие туберкулеза в 12,8 раза (95% ДИ 5,1—32,8).

Ключевые слова: саркоидоз, туберкулез, неспецифические воспалительные заболевания легких, гамма-интерферон.

ANTIGEN-INDUCED INTERFERON- γ IN SARCOIDOSIS, TUBERCULOSIS AND NON-SPECIFIC INFLAMMATORY LUNG DISEASES

N.V. MAKAROVA, S.E. BORISOV, M.A. VLADIMIRSKIY, T.N. VLASIK

Abstract. The serum concentration of IFN- γ after 24-hours incubation with PPD/ESAT-6 was estimated in patients with sarcoidosis (67), tuberculosis (60) and non-specific lung inflammation (44). The mean concentration (picogram/ml) after PPD-incubation was significantly higher in tuberculosis ($302,1 \pm 32,6$; 95%CI 236,9—367,4) in comparison with sarcoidosis ($66,7 \pm 16,8$; 95%CI 33,2—100,2). After ESAT-6-incubation IFN- γ concentration in sarcoidosis was the lowest ($9,2 \pm 2,98$; 95%CI 3,3—15,2), in comparison with tuberculosis ($92,8 \pm 16,7$; 95%CI 59,3—126,3) and non-specific lung inflammation ($95,2 \pm 29,4$; 95%CI 35,9—154,4). The IFN- γ concentration level 70 picogram/ml (both PPD- and ESAT-6-induced) provides the diagnostic accuracy for sarcoidosis and tuberculosis differentiation 77,9%, sensitivity — 76,1%, specificity — 80%. Odds ratio for sarcoidosis in patients with IFN- γ concentration level less then 70 picogram/ml is 12,8 (95%CI 5,1—32,8).

Key words: sarcoidosis, tuberculosis, non-specific inflammatory lung diseases, γ -interferon.

Введение. Задача дифференциальной диагностики саркоидоза и туберкулеза достаточно сложна, причем в ряде случаев однозначное заключение о нозологической природе процесса не может дать и гистологическое исследование биоптатов ткани легкого и лимфатических узлов [2, 3]. Сходные жалобы, клинические и рентгенологические проявления затрудняют своевременное распознавание туберкулеза (особенно без бактериовыделения) и неспецифических пневмоний [1].

Новые возможности для дифференциальной диагностики туберкулеза и сходных с ним заболеваний органов дыхания открывает выделение высокоспецифичных антигенов *M. tuberculosis*, в том числе ESAT-6, и создание тест-систем, основанных на определении индуцированного ИФН- γ в сыворотке крови *in vitro* в ответ на стимуляцию антигенами, присутствующими только у *M. tuberculosis complex* [4, 5, 6, 9]. Предполагается, что применение высокоспецифичных антигенов обеспечит исключение ложноположительных и ложноотрицательных результатов, возможных при перекрестных (антиген-антитело) реакциях в кожных туберкулиновых тестах [8]. При этом по-разному оцениваются ситуации выявления латентной туберкулезной инфекции и активного туберкулеза [7, 8], особенно в регионах с высокой распространенностью туберкулезной инфекции.

Цель исследования — оценить возможность использования определения концентрации антиген-индуцированного ИФН- γ под воздействием туберкулина (PPD) и ESAT-6 в целях дифференциальной диагностики саркоидоза, туберкулеза и неспецифических воспалительных заболеваний легких среди жителей Российской Федерации, для которой характерно широкое распространение туберкулезной инфекции и относительно высокая заболеваемость туберкулезом.

Материал и методы. Проведено сопоставление клинических и иммунологических проявлений заболеваний легких различного генеза у 171 больного, находившегося в клинике фтизиопульмонологии ММА им. И.М. Сеченова в 2005—2008 гг. Специальный отбор больных не проводили, зачисление в группы осуществляли «сплошным» методом по мере госпитализации больных.

Среди больных преобладали мужчины (93 человека — 54,7%) и лица моложе 40 лет (99 человек — 57,9%). Практически все пациенты были госпитализированы впервые с целью установления диагноза и определения тактики ведения. Всем больным проведены общепринятые клинические, лабораторные, микробиологические, рентгенологические, функциональные исследования, по показаниям — морфологическая верификация диагноза (трансbronхиальная биопсия легких или прескаленная биопсия лимфоузла).

Первую группу составили 67 больных саркоидозом: у 4 (6%) человек был диагностирован саркоидоз внутригрудных лимфатических узлов (ВГЛУ), у 48 (72%) — саркоидоз ВГЛУ и легких, у 15 (22%) — генерализованный саркоидоз. 60 больных туберкулезом (ТБ) составили вторую группу; из них у 35 (58,3%) человек имел место инфильтративный ТБ, у 9 (15%) — диссеминированный, у 11 (18,3%) — очаговый, у 4 (6,7%) — туберкулемы, а у 1 (1,7%) пациентки диагностирован генерализованный ТБ с поражением легких, почек и маточных труб. В третью группу вошли 44 пациента с неспецифическими воспалительными заболеваниями легких (НВЗЛ); у 11 (25%) человек диагностирован

хронический обструктивный бронхит, у 24 (54,5%) — неспецифическая пневмония, у 3 (6,8%) — бронхиальная астма инфекционно-аллергического генеза, у 5 (11,4%) — необструктивный бронхит, у 1 (2,3%) пациента — неспецифический пневмосклероз.

Исследовали венозную кровь, которую немедленно после забора (не менее 3,5—4,0 мл) переносили в стерильную пробирку с 0,05 мл (50 ЕД) гепарина и, покачивая, перемешивали. Гепаринизированную кровь вносили по 1 мл в три лунки 24-луночного планшета, маркированные как К (контроль), PPD и ESAT-6, куда соответственно вносили по 10 мкл антигенов PPD (сухой очищенный туберкулин 50000 ТЕ, СГБ НИИ вакцин и сывороток) и ESAT-6. Затем образцы перемешивали при осторожном покачивании. После инкубации при 37°C в течение 20—24 ч из лунок, не перемешивая, извлекали 200—300 мкл плазмы для количественного иммуноферментного анализа (ИФА). Образцы плазмы до постановки ИФА хранили при температуре -20°C сроком до 1 мес. Перед анализом оттаявшие образцы тщательно перемешивали; повторное замораживание и оттаивание образцов не допускалось.

Применяли экспериментальную иммуноферментную тест-систему с использованием двух моноклональных антител. Посадочные моноклональные антитела (5 мкг/мл в карбонат-бикарбонатном буфере pH=9,6) инкубировали при температуре +4°C в течение ночи на 96-луночных полистироловых планшетах фирмы Nunc (США), отмывали 4 раза в 0,05% растворе твин-20; все последующие процедуры отмывки проводили аналогично. Для ИФА использовали два моноклональных антитела к различным детерминантам ИФН- γ : иммобилизованные в лунках планшета и детектирующие антитела, меченные биотином. ИФН- γ , связанный с помощью первых антител в лунках планшета, выявляли с помощью вторых биотин-меченых антител и ферментного конъюгата — стрептавидин-пероксидазы. После остановки реакции стоп-реагентом результаты анализировали с помощью микроридера MR-4 (США). Для определения концентрации ИФН- γ строили калибровочную кривую на основании измерения оптической плотности при 450 нм в лунках стандартного ИФН- γ с двукратным разведением от 280 пг/мл до 8,75 пг/мл. Чувствительность анализа — 10 пкг/мл. Определяли концентрацию ИФН- γ в образцах крови, инкубированных с антигенами PPD и ESAT-6, за вычетом уровня отрицательного контроля (концентрация ИФН- γ в контрольной пробирке без антигенов).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы SPSS 11,5. Показатели, подчиняющиеся нормальному распределению, представлены в виде $M \pm m$ (среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего); показатели с распределением, отличающимся от нормального, описывали при помощи медианы и диапазона колебаний или интерквартильного размаха; качественные показатели — в долях (процентах). Определены 95%-ные доверительные интервалы (ДИ) количественных показателей. Статистический межгрупповой анализ данных, не подчиняющихся нормальному распределению, проводили с помощью критерия Манна—Уитни.

Результаты и их обсуждение. Средние значения концентрации ИФН- γ при индукции PPD были наиболее высокими при ТБ и наименьшими при саркоидозе. Несмотря на то что максимальная концентрация PPD-индуцированного ИФН- γ отмечена у больного с НВЗЛ

(1172,4 пг/мл), распределение значений с первой по третью квартиль (25—75% процентиля) показало, что у большей части больных ТБ концентрация PPD-индуцированного ИФН-γ почти в 2 раза выше, чем при НВЗЛ и почти в 6,5 раз выше, чем при саркоидозе. При сравнении концентрации индуцированного ИФН-γ, в связи с далеким от нормального распределением независимых выборок, для определения достоверности использован U-тест по Манну—Уитни. Согласно данному тесту, концентрация PPD-индуцированного ИФН-γ статистически достоверно различалась между всеми тремя группами больных (табл. 1).

При индукции более специфическим антигеном ESAT-6 средние показатели концентрации ИФН-γ были существенно ниже, чем при индукции PPD. Более чем у половины больных саркоидозом индукция ИФН-γ на ESAT-6 отсутствовала. При НВЗЛ у основной части больных (75%) концентрация ESAT-6-индуцированного ИФН-γ не превышала 69 пг/мл. У некоторых больных во всех изучаемых группах выявлены показатели, существенно превышающие средние значения, но взаимосвязи высокой концентрации ESAT-6-индуцированного ИФН-γ и клинико-рентгенологической картины, лабораторных показателей, бактериовыделения не выявлено. Согласно U-тесту по Манну—Уитни, концентрация ESAT-6-индуцированного ИФН-γ достоверно отличалась между больными ТБ и саркоидозом, ТБ и НВЗЛ, а также между саркоидозом и НВЗЛ (табл. 2).

Исследование позволило определить пороговые значения концентрации антигениндуцированного ИФН-γ в сыворотке крови (табл. 3, 4). Оптимальное

соотношение чувствительности и специфичности обеспечивается при пороговой концентрации 70 пг/мл, превышение которой свидетельствует в пользу туберкулезной этиологии легочного процесса (как при использовании в качестве антигена-индуктора PPD, так и ESAT-6).

Диагностическая эффективность принятого критерия в дифференциальной диагностике саркоидоза и ТБ равна 77,9%, чувствительность — 76,1%, а специфичность — 80%. О высокой достоверности результатов свидетельствует критерий χ^2 ($p < 0,001$). При концентрации в плазме индуцированного ИФН-γ менее 70 пг/мл шансы на наличие у больного саркоидоза выше, чем на наличие туберкулеза в 12,8 раза (95% ДИ 5,1—32,8).

Диагностическая эффективность метода при принятом пороговом значении при дифференциальной диагностике ТБ и НВЗЛ равна 66,3%, чувствительность теста составила только 47,7% при удовлетворительной специфичности — 80%. Критерий χ^2 свидетельствует о достоверности результатов ($p < 0,001$). При концентрации в плазме индуцированного ИФН-γ менее 70 пг/мл шансы на наличие у больного НВЗЛ выше, чем на наличие ТБ, в 3,7 раза (95% ДИ 1,4—9,6).

Из обследованных пациентов у 48 (80%) больных туберкулезом концентрация ИФН-γ превысила 70 пг/мл при использовании в качестве антигена-индуктора и PPD и ESAT-6. В то же время данный порог превысила концентрация индуцированного ИФН-γ у 16 (23,9%) пациентов с саркоидозом и у 21 (47,7%) пациента с НВЗЛ.

Концентрация ИФН-γ ниже 70 пг/мл отмечена у 12 (20%) больных туберкулезом, у 51 (76,1%) больного

Таблица 1

Статистические показатели концентрации ИФН-γ при индукции PPD

Заболевание	n	$M \pm m$	95%-ный ДИ	Min/max	Процентили 25—75%
Туберкулез ¹	60	302,1±32,6	236,9—367,4	13,8/1069	110—409,5
Саркоидоз ²	67	66,7±16,8	33,2—100,2	0/810	0—68,97
НВЗЛ ³	44	198,2±41,9	113,7—282,7	0/1172,4	4,7—268,5

U-тест по Манну—Уитни	p
1,2	0,001
1,3	<0,0005
2,3	0,002

Таблица 2

Статистические показатели концентрации ИФН-γ при индукции ESAT-6

Заболевание	n	$M \pm m$	95%-ный ДИ	Min/max	Процентили 25—75%
Туберкулез ¹	60	92,8±16,7	59,3—126,3	0/517	17,8—86,2
Саркоидоз ²	67	9,2±2,98	3,3—15,2	0/127,6	0—0
НВЗЛ ³	44	95,2±29,4	35,9—154,4	0/910,34	0—69

U-тест по Манну—Уитни	p
1,2	<0,0005
1,3	0,013
2,3	<0,0005

Таблица 3

Диагностические критерии наличия саркоидоза или туберкулеза в зависимости от пороговой величины концентрации ИФН-γ

Показатель	Пороговые величины индуцированного ИФН-γ на оба антигена		
	<50 пг/мл	<70 пг/мл	<100 пг/мл
Число больных	46	51	56
Отношение шансов (OR) [95% ДИ]	14,2 [5,3—39,4]	12,8 [5,1—32,8]	18,4 [6,9—50,2]
Чувствительность [95% ДИ], %	68,7 [60,6—74,7]	76,1 [67,8—82,7]	83,6 [75,5—89,7]
Специфичность [95% ДИ], %	86,7 [77,6—93,1]	80 [70,7—87,3]	78,3 [69,3—85,2]
Диагностическая эффективность, %	77,2	77,9	81,1
Критерий χ^2	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$

Диагностические критерии наличия НВЗЛ или туберкулеза в зависимости от пороговой величины концентрации ИФН-γ

Показатель	Пороговые величины индуцированного ИФН-γ на оба антигена		
	<50 пг/мл	<70 пг/мл	<100 пг/мл
Число больных	15	21	26
Отношение шансов (OR) [95% ДИ]	3,4 [1,2—9,9]	3,7 [1,4—9,6]	5,2 [2,04—13,6]
Чувствительность [95% ДИ], %	34,1 [23,6—42,8]	47,7 [36,1—57,9]	59,1 [47,2—69,3]
Специфичность [95% ДИ], %	86,7 [79—93]	80 [71,5—87,4]	78,3 [69,6—85,8]
Диагностическая эффективность, %	64,4	66,4	70,2
Критерий χ^2	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,05$

саркоидозом, у 23 (52,3%) больных НВЗЛ. Шансы на наличие туберкулеза легких при концентрации антигениндуцированного ИФН-γ более 70 пг/мл выше в 8 раз [95% ДИ 3,6—18,1], чем на наличие нетуберкулезного заболевания. При этом чувствительность метода составляет 80% [95% ДИ 69,6—88,1], а специфичность — 66,7% [95% ДИ 61—71]. Диагностическая эффективность принятого критерия для дифференциальной диагностики туберкулеза и нетуберкулезных заболеваний легких равна 71,4% (по критерию χ^2 $p < 0,001$).

Из 12 больных туберкулезом с концентрацией индуцированного ИФН-γ ниже 70 пг/мл (как на PPD, так и на ESAT-6) у 7 процесс носил распространенный характер, имелись выраженные признаки интоксикации, распад легочной ткани, бактериовыделение, лейкоцитоз, повышение СОЭ и γ-глобулинов крови. Скорее всего, сниженный выброс ИФН-γ у этих пациентов был связан с перераспределением продуцирующих ИФН-γ Т-лимфоцитов и их преобладанием в зоне воспаления, а не в периферической крови. Кроме того, низкие показатели ИФН-γ могут быть обусловлены истощением иммунной системы у больных с распространенными процессами, массивной гибелью Т-лимфоцитов в ходе защитной реакции организма.

Среди больных саркоидозом только у 2 (3,0%) пациентов концентрация индуцированного ИФН-γ на оба антигена была выше 70 пг/мл. Первый пациент за 4 года до появления диссеминированного процесса в легочной ткани и увеличения ВГЛУ перенес правосторонний экссудативный плеврит, по поводу которого получал антибиотики широкого спектра действия. Нельзя исключить, что плеврит у данного пациента имел специфический генез, и полученные нами результаты отражают имевшую место сенсибилизацию организма микобактериями туберкулеза. У второй пациентки изменения в легочной ткани и увеличение ВГЛУ выявлены в ходе обследования по поводу кожных изменений, первоначально трактуемых как липоидный некробиоз. В дальнейшем был морфологически верифицирован генерализованный саркоидоз с поражением ВГЛУ, легких, бронхов, кожи. У пациентки отсутствовали изменения гемограммы, биохимических и иммунологических показателей; отрицала пациентка и контакт с больными туберкулезом.

Полученные данные позволяют заключить, что определение антигениндуцированного ИФН-γ позволяет эффективно дифференцировать гранулематозные заболевания — саркоидоз и туберкулез, и в меньшей степени — туберкулез и НВЗЛ. Представляется, что данный диагностический метод представляет ценность для клиницистов в сложных дифференциально-диагностических случаях, особенно при отсутствии однозначного морфологического заключения.

Выводы:

1. Определение антигенспецифической индукции ИФН-γ позволяет более эффективно дифференцировать гранулематозные заболевания — саркоидоз и туберкулез, менее эффективно — туберкулез и НВЗЛ.

2. В качестве оптимального диагностического критерия туберкулеза возможно использовать пороговую величину концентрации ИФН-γ более 70 пг/мл в совокупности при инкубации с антигеном-индуктором PPD и антигеном-индуктором ESAT-6.

3. Продукция ИФН-γ клетками периферической крови после 24-часовой инкубации при индукции ESAT-6 меньше почти в 2 раза, чем при индукции PPD.

4. Отсутствие выброса ИФН-γ клетками периферической крови при индукции ESAT-6 у большинства больных с нетуберкулезными процессами в легких может подтверждать высокую специфичность данного антигена в отличие от PPD, когда возможно влияние предшествующей вакцинации и инфицирования нетуберкулезными микобактериями.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авдеев, С.Н. Тяжелая внебольничная пневмония / С.Н. Авдеев, А.Г. Чучалин // Рус. мед. журнал. — 2001. — Т. 9, № 5. — С. 177—178.
2. Соловьева, И.П. Гранулематозное воспаление и гранулематозные болезни / И.П. Соловьева // Патология. — М.: Медицина, 2002. — С. 106—120.
3. Шмелев, Е.И. Дифференциальная диагностика диссеминированных заболеваний легких неопухолевой природы / Е.И. Шмелев // Рус. мед. журнал. — 2001. — Т. 9, № 21 (140). — С. 919—922.
4. Brock, I. Performance of whole blood IFN-gamma test for tuberculosis diagnosis based on PPD or specific antigens ESAT-6 and CFP-10 / I. Brock, M.E. Munk, A. Kok-Jensen, P. Andersen // Int. J. Tuberc. Lung. Dis. — 2001. — Vol. 5. — P. 462—467.
5. Ferrand, R.A. Interferon-gamma responses to ESAT-6 in tuberculosis patients early into and after anti-tuberculosis treatment / R.A. Ferrand, G.H. Bothamley, A. Whelan [et al.] // Int. J. Tuberc. Lung. Dis. — 2005. — Vol. 9 (9). — P. 1034—1039.
6. Mazurek, G.H. Detection of Mycobacterium Tuberculosis Infection by Whole-Blood Interferon-Gamma Release Assay / G.H. Mazurek, P.A. LoBue, C.L. Daley, J. Bernardo [et al.] // Clin. Infect. Dis. — 2003. — Vol. 36 (9). — P. 1207—1208.
7. Mori, T. Specific detection of tuberculosis infection; an interferon-γ based assay using new antigens / T. Mori, M. Sakatani, F. Yamagishi, T.T. Takashima [et al.] // Am. J. Respir. Crit. Care Med. — 2004. — Vol. 170 (1). — P. 59—64.
8. Pai, M. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: Part I. Latent tuberculosis / M. Pai, S. Kalantri, K. Dheda // Expert. Rev. Mol. Diag. — 2006. — № 6 (3). — P. 413—422.
9. Pai, M. Interferon-gamma release assays: what is their role in the diagnosis of active tuberculosis? / M. Pai, D. Menzies // Clin. Infect. Dis. — 2007. — Vol. 44. — P. 74—77.