**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого" Министерства здравоохранения Российской Федерации Кафедра туберкулеза с курсом ПО**

**Иммунодиагностика**

Выполнила: ординатор Садовская Ольга Юрьевна

Проверил: к.м.н., зав.кафедрой Омельчук Д.Е

Красноярск 2022г

Оглавление

[**Введение** 2](#_Toc106181240)

[**История создания туберкулина** 3](#_Toc106181241)

[**Приготовление туберкулина** 5](#_Toc106181242)

[**Цели** **туберкулинодиагностики** 6](#_Toc106181243)

[**Противопоказания к постановке пробы Манту** 6](#_Toc106181244)

[**Интерпретация результатов пробы Манту** 7](#_Toc106181245)

[**Диаскинтест – аллерген туберкулезный рекомбинантный** 9](#_Toc106181246)

[**Преимущества Диаскинтеста в иммунодиагностике** 12](#_Toc106181247)

[**Показания для проведения Диаскинтеста** 12](#_Toc106181248)

[**Интерпретация результатов** 14](#_Toc106181249)

[**Противопоказания для постановки Диаскинтеста** 14](#_Toc106181250)

[**Заключение** 15](#_Toc106181251)

[**Список литературы** 16](#_Toc106181252)

# **Введение**

Несмотря на снижение в последние несколько лет заболеваемости детей туберкулёзом, а в отдельных регионах России и взрослых, показатель заболеваемости по стране в целом остается на высоком уровне. Россия по данным ВОЗ входит в 30 стран, несущих основное бремя туберкулеза. В этих условиях массовые мероприятия, направленные на профилактику (вакцинация БЦЖ) и диагностику (проба Манту) туберкулеза у детей, остаются актуальными.

Внутрикожная проба Манту с туберкулином на протяжении 100 лет остается одним из наиболее широко распространенных методов диагностики туберкулеза у детей в мире. Проба Манту обладает рядом очевидных достоинств: четкое дозирование, простота постановки и учета результатов реакции и дешевизна препарата. Однако пробе с туберкулином, состоящим из большого количества антигенов, присущ и ряд недостатков. Наиболее значимыми из них является положительный ответ как у инфицированных, так и иммунизированных БЦЖ лиц, наличие определенного числа ложных реакций.

Расшифровка генома M. tuberculosis, осуществленная более 15 лет назад, позволила установить гены, кодирующие белки ESAT-6 и CFP-10, делеция которых произошла в M. bovis BCG. Отечественные ученые разработали новый рекомбинантный препарат Диаскинтест – комплексный синтезированный гибридный белок ESAT6-CFP10, полученный путем трансфекции в штамм E. coli DLT 1279 клона pQE30-ESAT6-CFP10. Клинические испытания этого препарата и пятилетние постмаркетинговые исследования позволили установить, что Диаскинтест обладает высокой чувствительностью и специфичностью, позволяет дифференцировать поствакцинальную и инфекционную ГЗТ. В настоящее время наряду с туберкулиновой пробой Манту для диагностики и дифференциальной диагностики туберкулеза у детей используется диаскин-тест – внутрикожная проба с препаратом Диаскинтест, аллерген туберкулезный рекомбинантный в стандартном разведении.

# **История создания туберкулина**

Первый туберкулин приготовлен Робертом Кохом почти 130 лет назад культивированием микобактерий туберкулеза на мясном бульоне с глицерином, инактивацией культуры, фильтрованием и концентрированием среды. Он получил название АТК – альттуберкулин Коха (старый туберкулин Коха). В 1926 году для замены мясного бульона была предложена синтетическая среда, а туберкулину – название ОТ (old tuberculin – старый туберкулин). Первоначально эти туберкулины использовались для накожной пробы Пирке, в том числе градуированной. Внутрикожную туберкулиновую пробу одновременно предложили в 1908 г. Феликс Мендель и Шарль Манту. Эта проба получила название «проба Манту» и практически 100 лет была незаменимой. В любой человеческой популяции имеются индивидуумы, у которых ГЗТ в ответ на туберкулин не развивается даже при неоднократном введении вакцины БЦЖ. Причины отсутствия ответной реакции до настоящего времени не совсем ясны, тем более что у таких лиц обычно отмечается нормальный ответ на другие иммуногены. Имеются четкие иммунологические данные о том, что такие люди более чувствительны к последующему заражению вирулентными микобактериями туберкулеза, чем люди с нормальным ответом на вакцинацию. Было сделано заключение, что генетически предопределенный дефект иммунного ответа приводит к неспособности отвечать на антигены микобактерий. Впервые этот феномен описал много лет назад Lurie M.G. Отрицательные результаты пробы Манту могут отмечаться и в иммунологической фазе через 4–8 недель после ряда воздействий на иммунную систему вирусных и бактериальных инфекций или вакцинации. Реакция на туберкулин может зависеть от времени года постановки теста, факта введения иммуноглобулина или переливания крови, приема химиотерапевтических и иммуносупрессивных средств, онкологических заболеваний или ВИЧ, острых форм туберкулеза, и в значительной мере, от антигенного состава используемого препарата туберкулина и его специфической активности. В соответствии с современными представлениями, анергия к туберкулину у больных туберкулезом может быть связана с неполным ответом Т-клеток, снижением антигенспецифической пролиферации и способности к продукции интерлейкина-2 и интерферона-гамма. До 1954 года, несмотря на низкую специфичность и значительное количество побочных аллергических реакций на чужеродный белок, основным препаратом для диагностики туберкулеза являлся АТК. В конце 1930-х годов в США под руководством Seibert F.B. разработан туберкулин, свободный от чужеродных белков, – путем осаждения туберкулопротеина сульфатом аммония из инактивированной культуры микобактерий человеческого вида был получен очищенный туберкулин, названный PPD-S. PPD – рurified protein derivative (очищенный протеин дериват), S – Seibert. В отечественной литературе используется также русский перевод этой аббревиатуры – ППД. Сравнительная оценка АТК и PPD показала более высокую специфичность очищенного туберкулина. Очищенный туберкулин используют также для модифицированной накожной пробы – теста уколов (Prick test, Tine test). Такого рода тесты обычно применяют в странах, где не проводится вакцинация БЦЖ. К попытке вернуться к накожным методам диагностики туберкулеза относится разработка туберкулиновой мази различной специфичности и туберкулиновой марки, которые не нашли широкого применения в практике. В нашей стране работы по созданию туберкулина PPD проводились с 1939 г. под руководством Линниковой М.А. В 1954 г. этот туберкулин, названный в честь автора PPD-L (ППД-Л), был внедрен в практику здравоохранения.

# **Приготовление туберкулина**

Все очищенные туберкулины готовят по одной общей схеме: выращивают микобактерии на плотных, затем на жидких средах, инактивируют посевы, выделяют осажденим белок – туберкулопротеин и проводят его очистку. Количество пересевов штаммовпродуцентов регламентировано требованиями ВОЗ. Однако технология приготовления очищенных туберкулинов варьируется: используются разные туберкулиногенные штаммы, различный состав питательных сред, сроки и способ выращивания микобактерий (глубинное или поверхностное), реактивы для осаждения белка, влияющие на его состав, способы последующей очистки туберкулопротеина. Варьировались также туберкулиногенные штаммы и сроки их выращивания. Осаждение белка проводят трихлоруксусной кислотой (ТХУ), обработкой сульфатом аммония или их сочетанием. Туберкулопротеин является смесью антигенов и антигенных детерминант микобактерий с молекулярной массой от нескольких сотен до 200 000 Да.

# **Цели** **туберкулинодиагностики**

Кожные тесты с туберкулином являются традиционным методом диагностики туберкулеза. Их широко используют также для отбора контингентов на вакцинацию и ревакцинацию БЦЖ детей, для оценки результативности противотуберкулезных прививок и для эпидемиологического анализа инфицирования населения микобактериями. Реакция на туберкулин является классическим примером реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). Ее характерные признаки – позднее проявление (начинается через 5–6 ч и при максимуме в 48–72 ч продолжается несколько дней), появление индурата в основном за счет клеточной инфильтрации. Очень редко развиваются везикулы и некроз. Морфологически реакция на туберкулин характеризуется преобладанием мононуклеарных клеток – малых и средних лимфоцитов и моноцитов. Только небольшая часть этих клеток является лимфоцитами, сенсибилизироваными к туберкулину. Большинство клеток вовлекается в реакцию биологически активными цитокинами, выделяемыми сенсибилизированными лимфоцитами.

# **Противопоказания к постановке пробы Манту**

Плановую Пробу Манту нельзя проводить в случае:

-Заболевания кожи на месте инъекции

- Острых и хронических инфекционных болезней (проба Манту проводится спустя месяц после выздоровления)

-Аллергии, лихорадки

-Эпилепсии

# **Интерпретация результатов пробы Манту**

Результат пробы оценивают врач или обученная медсестра через 72 ч с момента ее проведения. Реакция на туберкулин возможна в виде гиперемии (покраснения кожи) и образования папулы (возвышающегося над кожей плотного округлого участка). Оценка пробы Манту состоит из учета размеров папулы и оценки выраженности гиперемии. Измерение проводят в направлении, поперечном к оси руки, результат учитывают в миллиметрах. Измеряется только размер папулы, а не размер зоны гиперемии (покраснения). Размер покраснения учитывают только тогда, когда папула не возникла.

Варианты реакции при пробе Манту:

-отрицательная — на коже нет изменений;

-сомнительная — имеется покраснение любого размера без папулы, либо папула не более 2-4 мм;

-положительная слабовыраженная — размер папулы 5-9 мм;

-положительная умеренно выраженная — размер папулы 10-14 мм;

-положительная выраженная — размер папулы 15-16 мм;

-чрезмерная (гиперергическая) — размер папулы превышает 17 мм или имеются выраженные признаки воспаления (реакция лимфоузлов, изъязвление кожи и т. п.).

Отрицательная реакция Манту свидетельствует о том, что в организме отсутствуют антитела, «знакомые» с туберкулезной бактерией. Это означает, что ребенок не инфицирован, либо нет иммунной реакции на вакцинацию БЦЖ.

Сомнительная проба приравнивается к отрицательной.

Положительная проба может быть, как следствием вакцинации БЦЖ, так и признаком инфицирования.

Чтобы оценить вероятность инфицирования – нужно смотреть на вираж туберкулиновой пробы — переход отрицательной реакции Манту в положительную (не связанный с предшествующей вакцинацией) или увеличение диаметра папулы по сравнению с результатом предыдущей пробы на 6 и более миллиметрах.

Также признаками инфицирования являются:

-гиперергическая реакция;

-стойко (более 4 лет) сохраняющаяся реакция с папулой 12 и более мм;

-постепенное (в течение нескольких лет) усиление чувствительности к туберкулину с образованием инфильтрата размерами 12 мм и более.

Положительный результат пробы Манту без учета других диагностических критериев не является основанием для постановки диагноза и начала какого-либо лечения.

Оценивать реакцию может только врач, при необходимости ребенка направят на дополнительное обследование к фтизиатру.

# **Диаскинтест – аллерген туберкулезный рекомбинантный**

Перечень методов, позволяющих осуществить раннее выявление туберкулеза на этапе первичного инфицирования, провести оценку активности локальных специфических изменений, а также дифференциальную диагностику туберкулеза, поствакцинальных осложнений БЦЖ, невелик. До недавнего времени эти мероприятия довольно часто вызывали значительные трудности. В чем же заключалась их причина? В основе ранней диагностики туберкулеза у детей и подростков лежит обнаружение специфической сенсибилизации к микобактериям туберкулеза (МБТ), для обнаружения которой в нашей стране традиционно используют пробу Манту с 2 ТЕ, выявляющую реакцию гиперчувствительности замедленного типа. Используемый для данной пробы туберкулин Линниковой представляет собой смесь более чем 200 антигенов, полученных из микобактерий человеческого и бычьего типов, которые также содержатся и в других, в частности, нетуберкулезных микобактериях. Положительный результат на введение туберкулина свидетельствует о наличии предварительной сенсибилизации организма полноценным антигеном, содержащимся в вирулентных или ослабленной вирулентности МБТ. Данная сенсибилизация возникает либо при спонтанном инфицировании, либо в результате вакцинации БЦЖ. В связи с этим проба Манту с 2ТЕ ППД-Л не позволяет с достаточной степенью эффективности различить поствакцинальную и инфекционную гиперчувствительность замедленного типа. Наличие поствакцинальной аллергии затрудняет своевременную диагностику первичного инфицирования и проведение полноценного лечения туберкулезной инфекции, а в случае гипердиагностики первичного инфицирования проводится неоправданное назначение антибактериальных препаратов детям и подросткам с профилактической целью. Кроме этого, проведение дифференциальной диагностики инфекционной и поствакцинальной аллергии требует применения дополнительных исследований и диагностических процедур нередко даже в условиях стационара, что ведет к расходу бюджетных средств, а также затрудняет достоверную оценку распространенности инфицирования МБТ населения России. Следует также помнить о том, что положительный результат пробы Манту с 2 ТЕ ППД-Л может быть обусловлен и другими причинами: инфицированием нетуберкулезными микобактериями (за счет наличия общих микобактериальных антигенов и перекрестной сенсибилизации), аллергической реакцией организма, ибо туберкулин является антигеном; возрастом, гормональным фоном, недавно перенесенными инфекциями и др. При работе с пациентами, кроме активных форм специфического процесса, фтизиатру приходится сталкиваться с посттуберкулезными изменениями на стадии клинического излечения, а также с впервые выявленным туберкулезом на стадии обратного развития в фазе начинающегося уплотнения. С последним имеют дело фтизиатры при работе с детьми и подростками, а решение вопроса об активности локальных туберкулезных изменений нередко вызывает определенные трудности. Эти трудности обусловлены рядом объективных причин: бессимптомным или малосимптомным течением туберкулеза, наблюдаемым в значительной части случаев, отсутствием изменений в крови, необходимостью достаточного длительного (от 2 до 6 месяцев) времени для оценки активности процесса по динамике рентгенологических данных, низким удельным весом бактериовыделителей среди больных детей. Неправильная оценка активности туберкулезных изменений приводит, с одной стороны, к необоснованному длительному применению противотуберкулезных препаратов, что вызывает избыточную медикаментозную нагрузку на организм и излишние материальные затраты, связанные с длительным диспансерным наблюдением пациента у фтизиатра. С другой стороны, происходит неоправданно раннее прекращение лечения и снятие с диспансерного учета, что увеличивает риск развития рецидива специфического процесса. Как известно, вакцинация БЦЖ является одной из важных мер по предупреждению развития туберкулеза и особенно его осложненных форм у детей раннего возраста. Однако не все дети нормально воспринимают естественную диссеминацию микобактерий M. bovis BCG и в ряде случаев на введение вакцины БЦЖ развиваются патологические очаги в различных органах и системах, так называемые поствакцинальные осложнения. Диагностика локальных осложнений после введения вакцины БЦЖ в виде периферических лимфаденитов и холодных абсцессов у детей раннего возраста по пробе Манту с 2ТЕ ППД-Л вызывает большие проблемы на этапе выявления и дифференциальной диагностики этиологии поражения, так как ее положительный результат обусловлен поствакцинной реакцией на введение туберкулина.

Все вышеуказанные проблемы сделали актуальной разработку нового диагностического теста – более чувствительного и специфичного, чем проба Манту. Это удалось лишь после завершения исследований по первичной структуре генома M. tuberculosis, установивших антигенные детерминанты, присущие только этому микроорганизму и позволяющие дифференцировать вакцинальный иммунитет, развивающийся в результате вакцинации БЦЖ, а также иммунные реакции на нетуберкулезные микобактерии и M. tuberculosis. В процессе этих исследований было установлено, что M. tuberculosis кодирует синтез двух секреторных белков ESAT-6 и CFP-10, отсутствующих в штаммах BCG M. bovis, из которых готовят вакцины БЦЖ и БЦЖ-М, а также у большинства непатогенных микобактерий. Именно эти белки выявляют гиперчувствительность замедленного типа при инфицированности M. tuberculosis (humanus или bovis) и не дают реакции у вакцинированных БЦЖ.

В результате многолетней работы в лаборатории биотехнологии НИИ молекулярной медицины ММА им. И.М. Сеченова был создан новый реагент для кожного теста, получивший название «Диаскинтест» – внутрикожный диагностический тест, представляющий собой рекомбинантный белок, продуцируемый генетически модифицированной культурой Escherichia coli. Препарат содержит два связанных между собой антигена – CFP-10 и ESAT-6, присутствующих в вирулентных штаммах МБТ, в том числе M. tuberculosis и M. bovis.

# **Преимущества Диаскинтеста в иммунодиагностике**

В процессе доклинических испытаний «Диаскинтеста» было установлено, что он безопасен, чувствителен, специфичен в отношении вирулентных штаммов МБТ. В отличии от туберкулина, ни в одном эксперименте «Диаскинтест» не вызывал гиперчувствительности замедленного типа у животных, вакцинированных M. bovis ВСG. Клинические испытания показали, что препарат «Диаскинтест» не обладает сенсибилизирующим действием, не токсичен. Неспецифическая аллергия при его введении отсутствует, а гиперергические реакции наблюдаются лишь в 2-14% случаев. «Диаскинтест» обладает высокой чувствительностью, вызывая положительную ответную реакцию у больных туберкулезом детей более чем в 90% случаев, а у больных взрослых – более чем в 78%. Специфичность «Диаскинтеста» значительно превосходит таковую туберкулина. В отличие от туберкулина, «Диаскинтест» не вызывает ответную реакцию гиперчувствительности замедленного типа у вакцинированных БЦЖ, но не инфицированных МБТ лиц. Следовательно, с помощью «Диаскинтеста» можно выявить сенсибилизацию именно к вирулентным МБТ и ограничить круг «подозреваемых» на наличие латентного туберкулеза для назначения превентивной химиотерапии. Таким образом, «Диаскинтест» характеризуется, по сравнению с туберкулином, более высокой клинической эффективностью в отношении идентификации туберкулезной инфекции; доказано и его фармакоэкономическое преимущество перед пробой Манту с 2 ТЕ ППД-Л.

«Диаскинтест» в значительной степени позволил преодолеть трудности диагностики туберкулеза и у ВИЧ инфицированных лиц: ввиду зависимости чувствительности пробы Манту с 2ТЕ ППД-Л от стадии ВИЧ-инфекции, а также вероятностного наличия инфекций, вызванных нетуберкулезными микобактериями, ее информативность была недостаточной. Применение «Диаскинтеста» в качестве дополнительного метода позволило улучшить качество диагностики туберкулеза у ВИЧ-инфицированных лиц.

# **Показания для проведения Диаскинтеста**

Все вышеперечисленное обосновало внедрение препарата в медицинскую практику. «Диаскинтест» применяется во всех возрастных группах и показания для его проведения определены приказом МЗ и СР РФ №855 от 29.10.2009 г.:

1. Диагностика туберкулеза и оценка активности процесса;

2. Дифференциальная диагностика туберкулеза;

3. Дифференциальная диагностика поствакцинальной и инфекционной аллергии (гиперчувствительности замедленного типа);

4. Наблюдение за эффективностью лечения в комплексе с другими методами.

Для раннего выявления туберкулеза внутрикожную пробу с препаратом «Диаскинтест» проводят лицам, направленным в противотуберкулезное учреждение для дообследования на наличие туберкулезного процесса по результатам массовой туберкулинодиагностики и лицам, относящимся к группам высокого риска по заболеванию туберкулезом с учетом эпидемиологических, медицинских и социальных факторов риска. Факторами высокого риска заболевания туберкулезом являются согласно приказу:

– эпидемиологические (контакт с больным туберкулезом человеком или животным);

– медико-биологические: сахарный диабет, язвенная болезнь, психоневрологическая патология, частые ОРВИ в анамнезе, хронические заболевания различных органов и систем при торпидном, волнообразном течении и неэффективности традиционных методов лечения; длительный прием (более месяца) цитостатических, глюкокортикоидных препаратов, иммунодепрессантов; ВИЧ-инфекция, перинатальный контакт у детей по ВИЧ-инфекции;

– социальные: алкоголизм, наркомания, пребывание в местах лишения свободы, безработица, беспризорность детей и подростков, попадание детей в детские приюты, детские дома, социальные центры и др.; миграция.

В соответствии с приказом, пациенты в возрасте старше 18 лет с впервые выявленными сомнительными или положительными пробами подлежат полному клинико-рентгенологическому обследованию в условиях противотуберкулезного диспансера. При отсутствии у данных пациентов по результатам обследования признаков локального туберкулеза они нуждаются в наблюдении у фтизиатра по «0» группе диспансерного учета с проведением по показаниям лечебнопрофилактических мероприятий. С целью дифференциальной диагностики туберкулеза с другими заболеваниями внутрикожную пробу с препаратом «Диаскинтест» проводят в комплексе с клинико-лабораторным и рентгенологическим обследованием в условиях противотуберкулезного учреждения.
Для наблюдения за пациентами, состоящими на учете у фтизиатра с различными проявлениями туберкулезной инфекции, в условиях противотуберкулезного учреждения внутрикожную пробу с «Диаскинтестом» проводят при контрольном обследовании во всех группах диспансерного учета с интервалом 3-6 месяцев.

# **Интерпретация результатов**

Препарат «Диаскинтест» вводится строго внутрикожно в дозе 0,1 мл. Результат пробы оценивается через 72 часа путем измерения размера гиперемии или инфильтрата (папулы) в миллиметрах прозрачной линейкой, установленной перпендикулярно длиннику предплечья. При этом гиперемия измеряется только в случае отсутствия папулы.

Ответная реакция учитывается как:

-отрицательная, – при полном отсутствии инфильтрата и гиперемии или при наличии уколочной реакции;

-сомнительная, – при наличии гиперемии без инфильтрата;

-положительная – при наличии инфильтрата любого размера;

-гиперергической считается проба при размере инфильтрата 15 мм и более, при везикуло-некротических изменениях и/или лимфангоите, лимфадените независимо от размера папулы.

Детям и подросткам с наличием сомнительной и положительной реакции на препарат показано полное обследование на туберкулез с последующим лечением и наблюдением в соответствующей группе диспансерного учета. При отрицательном результате реакции на препарат лечение по поводу туберкулезной инфекции не показано.

# **Противопоказания для постановки Диаскинтеста**

Противопоказаниями для постановки пробы являются острые и хронические (в период обострения) инфекционные заболевания за исключением случаев, подозрительных на туберкулез, соматические и другие заболевания в период обострения, распространенные кожные заболевания, аллергические состояния, эпилепсия, наличие карантина в детских коллективах по детским инфекциям.
В случаях дифференциальной диагностики локального туберкулеза с другими заболеваниями противопоказаний для постановки пробы с препаратом нет; исключение составляют лишь лица с индивидуальной непереносимостью препарата.

# **Заключение**

Таким образом, в настоящее время «Диаскинтест» уже применяется не только в противотуберкулезных учреждениях, но и начинает внедряться в работу учреждений общей лечебной сети при методическом обеспечении врача-фтизиатра и высказывается предположение о том, что «Диаскинтест» в ближайшем будущем может в значительной степени заменить пробу Манту с 2ТЕ ППД-Л. В этой связи знание показаний к применению «Диаскинтеста» необходимо не только фтизиатрам, но и врачам различных специальностей, работающим в лечебно-профилактических учреждениях общей лечебной сети.

# **Список литературы**

1. Авербах М.М., Гергерт В.Я., Литвинов В.И. Повышенная чувствительность замедленного типа и инфекционный процесс.

М.: Медицина;1974.

2. Авербах М.М., Литвинов В.И. Иммунологические основы противотуберкулезной вакцинации. М., 1970: 3–221

3. Леви Д.Т., Наконечная А.В., Обухов Ю.И., Рухамина М.Л., Александрова Н.В., Альварес Фигероа М.В. Туберкулезные аллергены – препараты для специфической диагностики туберкулеза

4. Белова Е. В., Стаханов В. А. Совершенствование диагностики туберкулезной инфекции у детей и подростков на основе рекомбинантных белков Mycobacterium tuberculosis в первичном звене здравоохранения // Здоровье и образование в XXI веке: сб. научных статей и тезисов XII международного конгресса. – М., 2011. – С. 294

5. Аксенова В. А., Барышникова Л. А., Сокольская Е. А. Новые возможности диагностики туберкулезной инфекции у детей и подростков // Рос. вестн. перинатологии и педиатрии. – 2011. – № 4. – С. 90-95