

Лекция для студентов 6 курса лечебного факультета

«Иммунодиагностика туберкулеза»



**доцент кафедры внутренних болезней,
к.м.н. Поздеева Н.В.**

Иммунодиагностика

специфические диагностические тесты с применением антигенов микобактерий туберкулеза, которые проводится с целью выявления сенсibilизации организма (инфицирования) к микобактериям туберкулеза:

- **Массовая**
- **Индивидуальная**

Применяются

- **аллерген туберкулезный очищенный жидкий в стандартном разведении (туберкулин)**
- **аллерген туберкулезный рекомбинантный в стандартном разведении (диаскинтест)**

Туберкулинодиагностика

это биологический тест, основанный на способности туберкулина вызывать в сенсibilизированном организме специфическую, воспалительно-аллергическую реакцию гиперчувствительности замедленного типа

Специфическая сенсibilизация к туберкулину возможна:

- на фоне вакцинации, ревакцинации вакциной БЦЖ
- при инфицировании различными типами микобактерий туберкулеза
- при развитии заболевания

Роберт Кох

**Немецкий ученый,
который в
1890-1891гг. впервые
приготовил и
применил
туберкулин на
практике**



Старый туберкулин Коха

представляет собой водно-глицериновую вытяжку из 6-8-недельных культур МБТ, выращенных на мясопептонном 4% глицериновом бульоне, простерилизованную в течение 1 ч. текучим паром, освобожденную путем фильтрации от бактериальных тел и сгущенную при температуре 90°C до 1/10 первоначального объема



-
- ❑ **F.Seibert и S.Glenn (1934г.) получили сухой очищенный туберкулин PPD (Purified protein derivate – очищенный белковый дериват)- PPD-S**
 - ❑ **В России сухой очищенный туберкулин - PPD-L изготовлен в 1939г. на безбелковой синтетической среде в Ленинградском НИИ вакцин сывороток, под руководством М.А.Линниковой**

Туберкулин

это водный экстракт убитой нагреванием культуры МБТ человеческого и бычьего типов, выращенных на синтетической среде. В туберкулин, в основном, входят продукты жизнедеятельности МБТ, живых МБТ в нем нет

Биохимический состав туберкулина

- 1) **белки (туберкулопротеины А, В, С) – 80%**
- 2) **углеводы (полисахарид I, II) – 10-15%**
- 3) **липидные фракции**
- 4) **нуклеиновая кислота**

1 Международная туберкулиновая единица (ТЕ)

это количество туберкулина, которое можно вводить без опасения вызвать слишком сильные реакции, 1 ТЕ позволяет выявить 80-90% положительных реакций у спонтанно инфицированных туберкулезом лиц

- 1 ТЕ PPD-S содержит 0,00002 мг чистого препарата и 0,00008 мг буферных солей**
- 1ТЕ ППД-Л содержит 0,00006 мг чистого препарата.**

Весовое соотношение международного стандарта PPD-S и PPD-L – 1:3

2 вида очищенного туберкулина

1. Аллерген очищенный туберкулезный сухой (сухой очищенный туберкулин). Выпускается в ампулах, содержащих 50.000 ТЕ. Срок годности – 5 лет



2. Аллерген туберкулезный очищенный жидкий (очищенный туберкулин в стандартном разведении 1:5000). Препарат выпускают в ампулах, в 0,1 мл раствора содержится 2ТЕ ППД-Л. Срок годности – 1 год



von Pirquet C.

Австрийский ученый.

- ▣ **В 1907г. предложил впервые применять туберкулин для выявления латентной туберкулезной инфекции путем скарификации поверхностного слоя кожи.**
- ▣ **Впервые использовал термин «аллергия»**



Основные виды туберкулиновых проб

- **Проба Манту с 2 ТЕ**
- **Градуированная кожная проба**
- **Проба Коха**

-
- Реакция по типу ГЗТ начинает развиваться через 6-8 часов после введения туберкулина. Пик реакции ГЗТ приходится на 48-72 часа.**
 - Клеточную основу которого составляют лимфоциты, моноциты, макрофаги, при гиперергических реакциях обнаруживаются специфические элементы с эпителиоидными и гигантскими клетками.**

3 типа ответных реакций на введение туберкулина:

- 1. Местная - формируется в месте введения туберкулина (*гиперемия, папула, везикулы, лимфангит, некроз*)**
- 2. Общая - характеризуется общими изменениями в организме человека (*ухудшения самочувствия, повышения температуры тела, головных болей, артралгий, изменений в анализах крови*)**
- 3. Очаговая - возникает в очаге специфического поражения. *Проявляется клинически появлением локальных симптомов со стороны патологического процесса; рентгенологически увеличение перифокального воспаления вокруг туберкулезных очагов.***

По степени интенсивности туберкулиновых реакций различают

- анергические (*отсутствие реакции*)**
- гипоергические (слабые)**
- нормергические (умеренные)**
- гиперергические (сильные)**

Интенсивность ответной реакции на туберкулин зависит

- 1) от массивности МБТ**
- 2) от вирулентности МБТ**
- 3) от общей реактивности организма**
- 4) дозы туберкулина**
- 5) частоты повторного введения**
- 6) состояния парааллергии - это состояние измененной чувствительности, вызванной одним антигеном по отношению к другим**

Анергия

- 1. Первичная (абсолютная) – отрицательные туберкулиновые пробы у лиц, не инфицированных МБТ**
- 2. Вторичная – потеря чувствительности к туберкулину у больных туберкулезом или лиц, ранее перенесших туберкулезную инфекцию:**
 - a) Пассивная (отрицательную вторичную анергию)- при тяжелых формах туберкулеза**
 - b) Активная (положительная вторичная анергию)- как вариант биологического излечения от туберкулезной инфекции или состояние иммуноанергии при «латентном микробизме», при некоторых заболеваниях**

Снижение туберкулиновой чувствительности может быть при

- **кори**
- **коклюше**
- **малярии**
- **вирусном гепатите**
- **раке**
- **лимфогранулематозе**
- **микседеме**
- **белковом голодании**
- **при применении антигистаминных препаратов, глюкокортикоидов, витаминов А, С, Д,**
- **после вакцинации против полиомиелита, кори**
- **на фоне приема ПТП (эффективность лечения)**

Повышение туберкулиновой чувствительности отмечается при

- **бронхиальной астме**
- **гипертиреозе**
- **ревматизме**
- **бруцеллезе**
- **пневмонии**
- **глистных инвазиях**
- **скарлатине**
- **обострении хр. заболеваний (тонзиллит, аденоидит, гепатохолецистит)**

Туберкулинодиагностика

массовая

индивидуальная

Цели массовой туберкулинодиагностики

1. Выявление лиц, входящих в группы риска заболевания туберкулезом (для ДН у фтизиатра):
 - a) впервые инфицированных МБТ ("вираж" туберкулиновых проб)
 - b) лиц инфицированных более года с гиперергическими и с усиливающимися (увеличение на 6 мм и более) реакциями на туберкулин
2. Отбор контингентов для противотуберкулезной прививки вакциной БЦЖ-М детей в возрасте 2 месяцев и старше, не получивших прививку в роддоме, и для ревакцинации вакциной БЦЖ
3. Ранняя диагностика туберкулеза у детей и подростков
4. Определение эпидемиологических показателей по туберкулезу (инфицированность населения МБТ, ежегодный риск инфицирования МБТ)

Для проведения массовой туберкулинодиагностики используют одну туберкулиновую пробу – Манту с 2 ТЕ

Цели индивидуальной туберкулинодиагностики:

- 1. дифференциальная диагностика поствакцинальной и инфекционной аллергии к туберкулину**
- 2. диагностика и дифференциальная диагностика туберкулеза и других заболеваний**
- 3. определение "порога" индивидуальной чувствительности к туберкулину**
- 4. определение активности туберкулезного процесса**
- 5. оценка эффективности противотуберкулезного лечения**

Противопоказания для проведения массовой туберкулинодиагностики:

- **кожные заболевания, острые и хронические инфекционные и соматические заболевания (в том числе эпилепсия) в период обострения**
- **аллергические состояния, ревматизм в острой и подострой фазах, бронхиальная астма, идиосинкразии с выраженными кожными проявлениями в период обострения**
- **карантин**
- **профилактические прививки**

***Для индивидуальной
туберкулинодиагностики
противопоказаний нет***

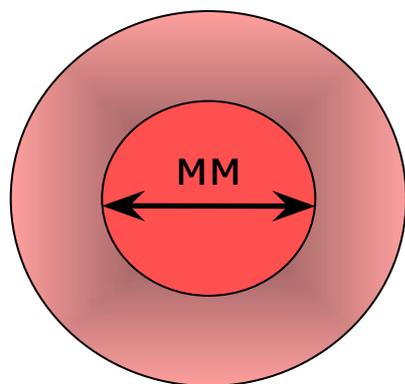
Реакция Манту с 2 ТЕ

Организация и техника проведения пробы Манту с 2 ТЕ



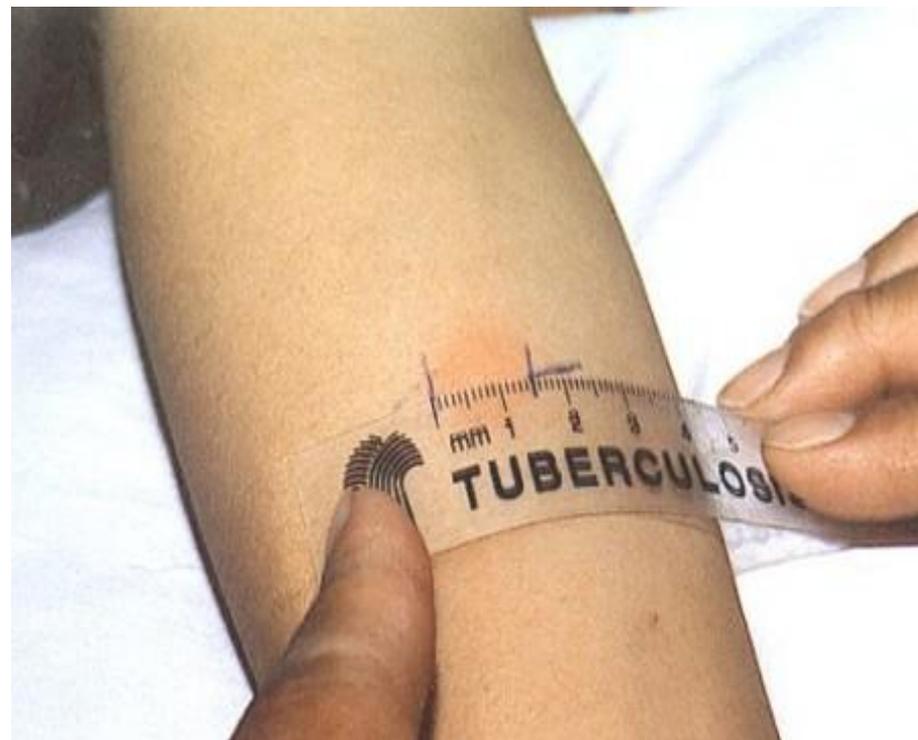
- производится только в процедурном кабинете (дома не проводится) специально обученной медицинской сестрой
- применяют однограммовые туберкулиновые шприцы разового использования
- строго внутривенно на внутреннюю поверхность предплечья вводят 0,1 мл раствора туберкулина, т.е. одну дозу

Оценка результатов пробы Манту (через 72 часа)



инфильтрат
(папула)

гиперемия



Оценка результатов пробы Манту (через 72 часа)

1. **отрицательная** - отсутствии инфильтрата (папулы) или гиперемии или наличие уколочной реакции (0-1 мм)
2. **сомнительная** - инфильтрат 2-4 мм или гиперемия любого размера без инфильтрата
3. **положительная** - инфильтрат диаметром 5 мм и более:
 - ***слабоположительные*** - инфильтрат 5-9 мм
 - ***средней интенсивности*** – инфильтрат 10-14 мм
 - ***выраженными*** – инфильтрат 15-16 мм
 - ***гиперергическими*** у детей и подростков - инфильтрат 17 и более, у взрослых 21 мм и более, а также везикуло-некротические реакции независимо от размера инфильтрата с лимфангоитом или без него.



Результаты пробы Манту у детей и подростков фиксируют:

- в учетной форме N 063/у,
- в медицинской карте ребенка (форма N 026/у) и
- в истории развития ребенка (форма N 112/у).

При этом отмечают:

- а) предприятие-изготовитель туберкулина, номер серии, срок годности
- б) дату проведения пробы
- в) введение препарата в правое или левое предплечье;
- г) результат в мм с указанием характера пробы (*гип.* или *ar* – гиперемия, ареола; *p* - папула; *ves* – везикула; *lf* – лимфаденит и др.)

Пример: РМ с 2 ТЕ ППД-Л (С 10/86 0511, годен до 01.06.12г., изготовлен в г. Санкт-Петербурга) от 25.07.11г., в/к 0,1мл, рука левая, – р 9 мм

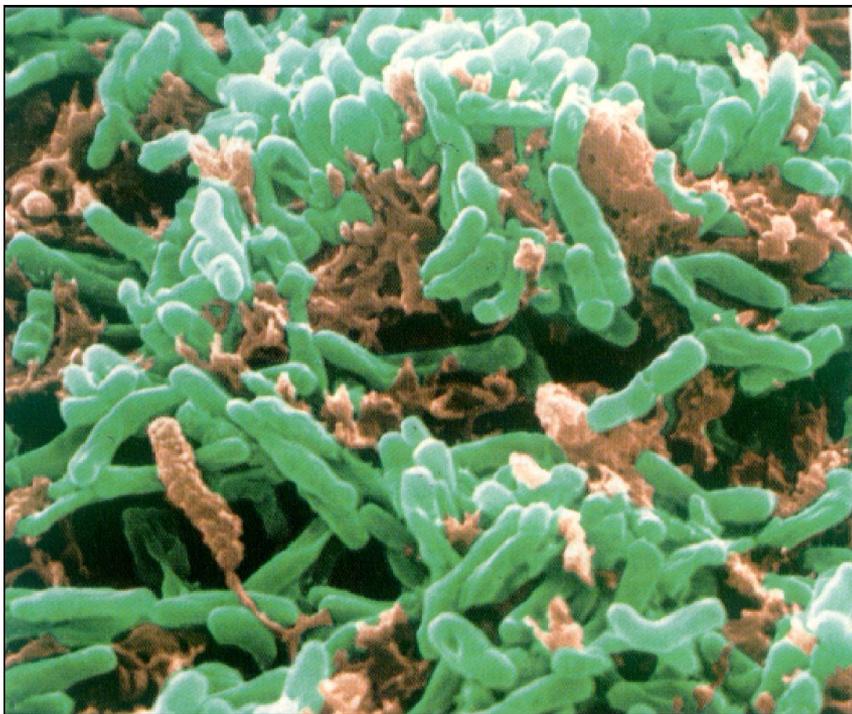
*По результатам массовой
туберкулинодиагностики к фтизиатру
необходимо направить следующих детей:*

- с подозрением на «вираж» туберкулиновых проб
- с усилением чувствительности к туберкулину на 6 мм и более в течение года или увеличение менее чем на 6 мм, но с образованием инфильтрата 12 мм и более
- с гиперергической чувствительностью к туберкулину
- из социальных групп риска, с выраженной реакцией на туберкулин
- со стойко (4-5 лет) сохраняющейся реакцией с инфильтратом 12 мм и более
- с постепенным нарастанием чувствительности к туберкулину в течение нескольких лет, с образованием инфильтрата 12 мм и более
- с монотонной туберкулиновой чувствительностью

Основные принципы ДД поствакцинной и инфекционной аллергии:

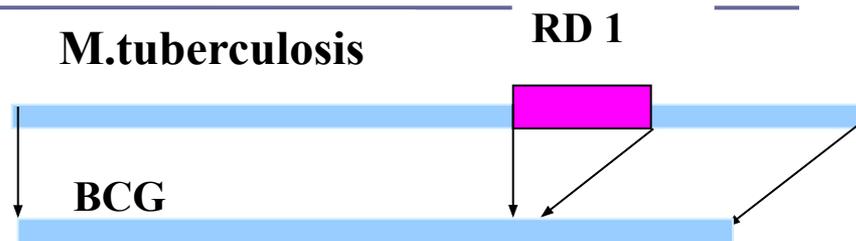
- Связь с V или RV вакциной БЦЖ (количество полученных прививок БЦЖ; наличие и размер послевакцинных рубчиков; срок прошедший после прививки)**
- Динамика и характер туберкулиновых проб (размер, зависимость от величины поствакцинального рубчика, внешний вид инфильтрата, пигментация после пробы)**
- Контакт с больным туберкулезом**
- Клинические симптомы туберкулеза**

ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОГРАФИЯ M.TUBERCULOSIS



Отсутствуют морфологические и серологические различия между *M.tuberculosis* и BCG (*M.Bovis*)

Генетические карты



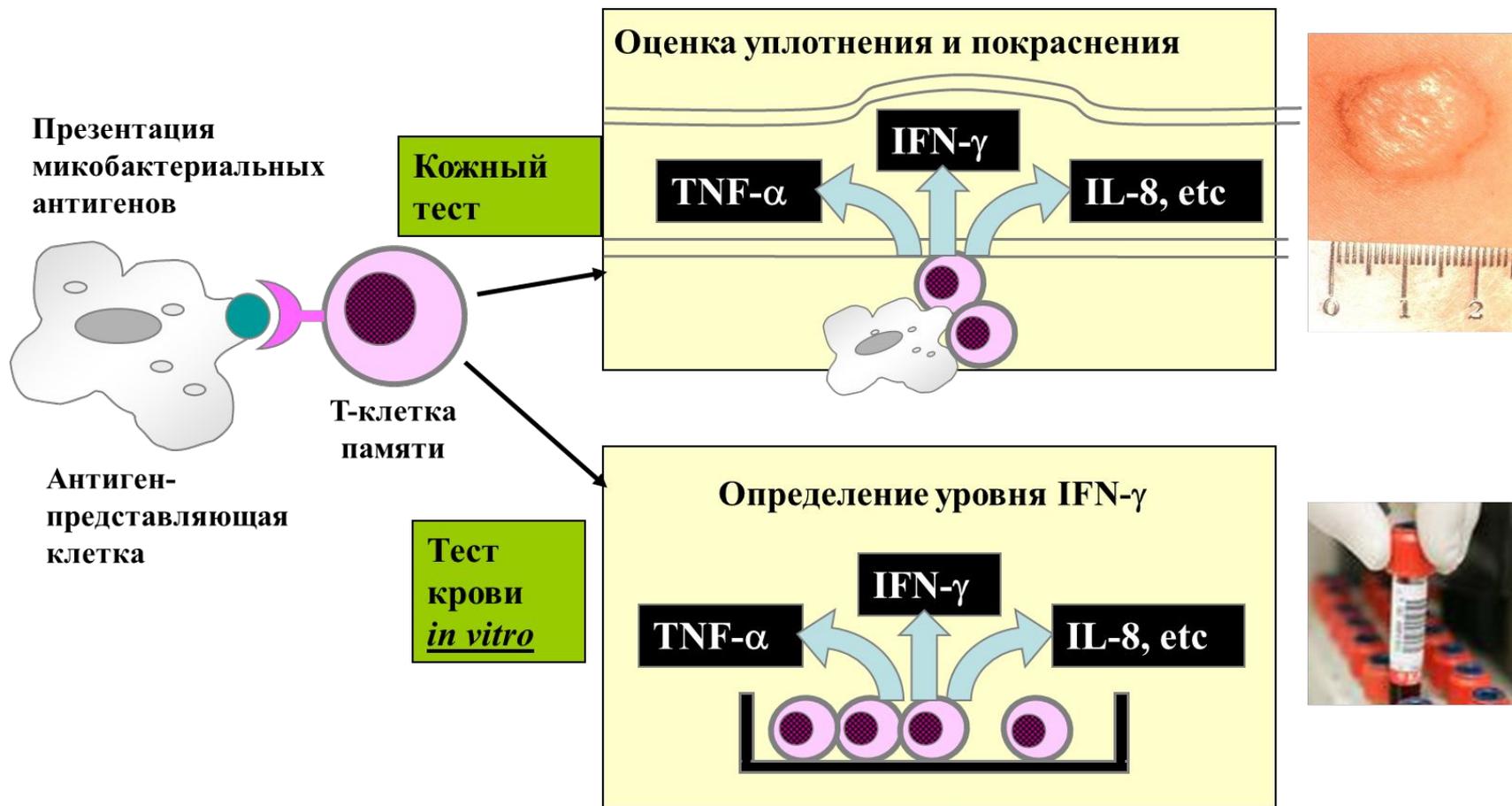
RD1 – 10КВ кодирует:

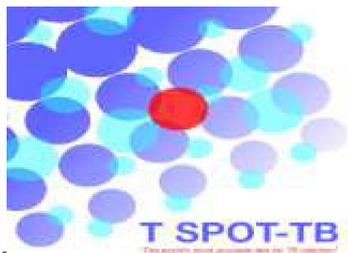
- early secretory antigenic target (ESAT) – 6 kD
- culture filtrate protein 10 (CFP) – 10 kD

Антигены микобактерий **ESAT-6** и **CFP 10** выделены из региона RD1 *M. tuberculosis*.

Регион RD1 отсутствует у всех штаммов БЦЖ (потерян во время первоначального выделения *M. bovis* BCG в период с 1908 по 1931 в Институте Пастера) – не дает ложно положительных ответов у БЦЖ вакцинированных лиц

Современные диагностические тесты: *in vivo*: Диаскинтест и *in vitro*: QuantiFERON и T-SPOT





Interferon- γ Release Assays



T SPOT™.TB

QuantiFERON®- Tb Gold In-Tube

*В настоящее время тесты применяются более чем
в 20 странах мира.*

**Включен в клинический
минимум обследования
групп риска по
заболеванию туберкулезом
с 2007г:**

- Великобритания
- Швейцария
- Канада

**Включен в клинический
минимум обследования
групп риска по
заболеванию туберкулезом
с 2005г:**

- США
- Австралия
- Франция

**В России тесты прошли клинические испытания в НИИФП и
находятся на регистрации в ГИСК им. Тарасевича**

Диагностические тесты на основе рекомбинантных белков используемые *in vitro*: QuantiFERON и T-SPOT

- ❑ **Высоко информативны**
- ❑ **Нетоксичны**
- ❑ **Безвредны**
- ❑ **Не обладают сенсibiliзирующими свойствами**

Однако:

- ❑ **высокая стоимость**
- ❑ **потребность в дополнительном оснащении**
- ❑ **клинической лаборатории**
- ❑ **внутривенные манипуляции у детей**

Не позволяют их использовать для массового обследования на туберкулез

Кожная проба с «диаскинтестом»



Диаскинтест (ДСТ)

- **внутрикожный диагностический тест, в основе которого лежит аллерген туберкулезный рекомбинантный (АТР) в стандартном разведении, представляющий собой рекомбинантный белок, продуцируемый генетически модифицированной культурой *Escherichia coli* BL21(DE3)/pCFP-ESAT6. Препарат содержит два связанных между собой антигена - CFP-10 (culture filtrate protein) и ESAT6 (Early secreted antigenic target), присутствующие в вирулентных штаммах МБТ. Эти антигены отсутствуют у *M. Bovis* вакцинного штамма.**

Различия

Туберкулин

- Аллерген туберкулезный
Препарат из антигенов
МБТ или их
культуральных
фильтратов
- Изготавливают из смеси
убитых нагреванием
фильтратов МБТ
человеческого и бычьего
видов

ДИАСКИНТЕСТ®

- Аллерген туберкулезный
рекомбинантный (АТР)
- Антигены микобактерий
ESAT-6 и CFP 10 выделены
из региона RD1 *M.*
tuberculosis.
- Регион RD1 отсутствует у всех
штаммов БЦЖ и НТМБ (не
дает положительной реакции)

Тест обладает:

- высокой чувствительностью (*частота положительных ответных реакций у лиц с активной туберкулезной инфекцией*)
- высокой специфичностью (*частота отсутствия реакции на препарат у здоровых лиц*) выше, чем у туберкулина

НО! не может быть использован вместо туберкулинового теста для отбора лиц на первичную вакцинацию и ревакцинацию БЦЖ.

Препарат ДИАСКИНТЕСТ®

реагирует на **наличие** в организме

растущей популяции МБТ,

**то есть является отражением достаточной бактериальной
нагрузки на организм**

Препарат используется во всех возрастных группах с целью

- 1. Диагностики туберкулеза и оценки активности процесса**
- 2. Дифференциальной диагностики туберкулеза**
- 3. Дифференциальной диагностики ПВА и ИА**
- 4. Наблюдения за эффективностью лечения в комплексе с другими методами**

Для раннего и своевременного выявления туберкулеза ДСТ проводят

- **Лицам, направленным в ПТУ для дообследования на наличие туберкулезного процесса**
- **Лицам, относящимся к группе высокого риска по заболеванию туберкулезом с учетом эпидемиологических, медицинских и социальных факторов риска**
- **Лицам, направленным к фтизиатру по результатам массовой туберкулинодиагностики**

Одна доза препарата (0,1 мл) содержит:

- рекомбинантный белок CFP-ESAT6 (0,2 мкг)**
- фенол (0,25 мкг) в качестве консерванта**
- полисорбат 80 (твин 80) в качестве стабилизатора**
- натрий фосфорно-кислый двузамещенный 2-водный**
- натрия хлорид**
- калий фосфорно-кислый однозамещенный**
- воду для инъекций - до 0,1 мл**

Техника постановки и методика оценки пробы с ДСТ аналогична внутрикожной пробе Манту с 2 ТЕ.

Оценка результатов ДСТ (через 72 часа)

- 1. Отрицательная реакция – отсутствие инфильтрата и гиперемии или наличия «уколочной реакции»**
- 2. Сомнительная – наличие гиперемии без инфильтрата**
- 3. Положительная – инфильтрат (папула) любого размера:**
 - слабо выраженная – инфильтрата до 5 мм или гиперемия 5 мм и более**
 - умеренно выраженная – инфильтрат 5-9 мм**
 - выраженная – инфильтрат 10 мм и более**
 - гиперергическая – инфильтрат 15 мм и более, везикуло-некротические изменения и (или) лимфангоит, лимфаденит независимо от размера инфильтрата**

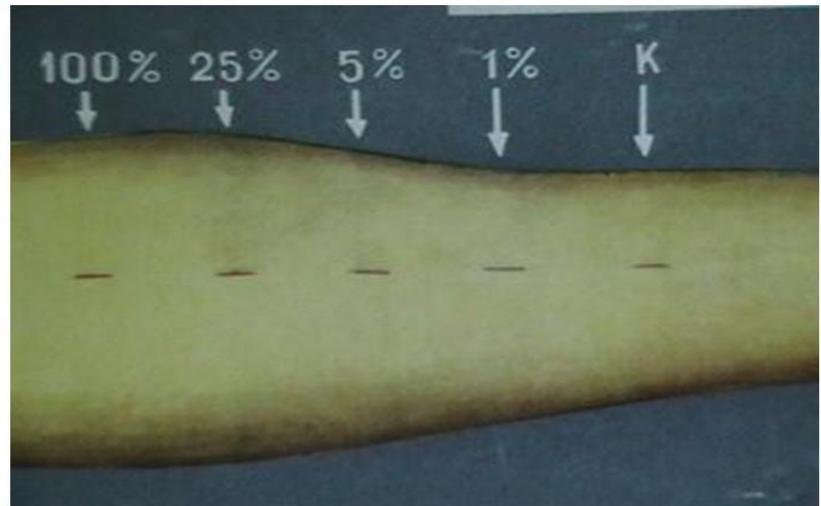


Отрицательная реакция на пробу может быть:

- У неинфицированных *M.tuberculosis* лиц
- У лиц ранее инфицированных *M.tuberculosis* с неактивной туберкулезной инфекцией
- У больных туберкулезом в период завершения инволюции туберкулезных изменений при отсутствии клинических, рентгено-томографических, инструментальных и лабораторных признаков активности процесса
- У лиц, излечившихся от туберкулеза
- У лиц на ранних стадиях инфицирования
- У больных туберкулезом с выраженными иммунодефицитом

Градуированная кожная проба

- представляет собой накожную туберкулиновую пробу со 100%, 25%, 5% и 1% туберкулином. Проводится в условиях противотуберкулезного стационара. ГКП имеет дифференциально-диагностическое значение при выяснении характера туберкулиновой аллергии



Оценка ГКП пробы по Шмелеву

- ▣ **Адекватная** реакция – нормергическая, анергическая, гиперергическая
- ▣ **Неадекватная** реакция – уравнительная, парадоксальная

Оценка ГКП пробы по Шмелеву

- 1) **нормэргическая** - умеренная чувствительность на большие концентрации туберкулина, отсутствие реакции на 1%, 5% туберкулин, на 25% туберкулин также может отсутствовать
- 2) **гиперэргическая** – ответные реакции на все разведения туберкулина, размеры инфильтратов увеличиваются по мере увеличения концентрации туберкулина, начиная с 1 до 100%, наличие везикуло-некротических реакций, лимфангита, лимфаденита, отсевов
- 3) **анергическая** - отсутствие ответа на все разведения туберкулина
- 4) **уравнительная** - примерно одинаковая интенсивность на разные концентрации туберкулина.
- 5) **парадоксальная** - меньшая интенсивность реакции на большие концентрации туберкулина, более интенсивные реакции на малые концентрации туберкулина

Проба Коха

- **представляет собой подкожное введение туберкулина. Используется для диагностики, определения активности туберкулезного процесса**
- **туберкулин вводят подкожно под лопатку или в плечо на стороне поражения в дозе 10- 20 ТЕ - детям, 20-50-100 ТЕ – взрослым (в зависимости от результата пробы Манту с 2 ТЕ)**
- **до постановки пробы проводят полное клинико-лабораторное обследование больного**

Оценивают реакцию (через 72 часа)

- **Общую**
- **Местную**
- **Очаговую**

Общая реакция:

- **проявляется повышением температуры на 0,5 и более °С, по сравнению с температурой до пробы (измерение проводят в течение 3 дней до пробы и на фоне нее – через 3 часа 6 раз в сутки) – у большинства отмечается повышение температуры на 2-е сутки, появлением и нарастанием симптомов интоксикации;**
- **проба Михайлова: осуществляется подсчет эозинофилов спустя через 30 мин. и 1 час после пробы. При положительной пробе отмечается снижение абсолютного числа эозинофилов**
- **проба Боброва (гемотуберкулиновая): при положительной пробе через 24, 48 часов отмечаем повышение СОЭ на 5 мм\ч, увеличение палочкоядерных нейтрофилов на 6 % и более, уменьшение содержания лимфоцитов на 10% и тромбоцитов на 20 %**

-
- **белково-туберкулиновая проба Рабухина Иоффе**: через 24, 48 часов снижается количество альбуминов, увеличивается количество глобулинов, за счет альфа-1, альфа-2 и гамма фракций, снижается альбумин-глобулиновый индекс. Отклонение показателей на 10% и более свидетельствуют в пользу положительной пробы Коха
 - **иммунотуберкулиновая проба**: при положительной пробе через 72 часа снижается реакция бласттрансформации лимфоцитов с фитогемаглютинином, увеличивается реакция бласттрансформации с ППД-Л, увеличиваются иммуноглобулины всех классов

Местная реакция

- **оценивается размер инфильтрата в месте введения туберкулина.**

Положительная реакция - инфильтрат 15-20–30 мм

Гиперергическая - более 30 мм.

Очаговая реакция

- оцениваются жалобы больного: появление локальных (грудных) симптомов или их нарастание свидетельствует в пользу положительной пробы
- объективно: выявление катаральных явлений в легких при перкуссии и аускультации также указывают на положительную пробу;
- выявление МБТ при 3-хкратном исследовании мокроты методом люминесцентной микроскопии и посевом после пробы – достоверный признак туберкулезной этиологии процесса;
- рентгенологическое исследование легких через 7-10 дней после пробы: при положительной пробе контуры очагов, фокусов становятся нечеткими, появляется инфильтрация по периферии их, отмечается появление новых очагов в легких
- на термографии в динамике можно выявить участки термоассиметрии.

Спасибо за внима

