

УДК 616.24-003.656.6:616-084

## Сравнительная эффективность иммуноферментных тест-систем для выявления маркеров туберкулезной инфекции

Л.Ф. Яковлева

ГУ «Республиканский научно-практический центр гигиены», г. Минск

### Comparative efficiency of ELISA tests - systems for revealing markers of a tubercular infection

L.F. Jakovleva

Republican scientific practical center of hygiene, Minsk

#### Аннотация

Представлены результаты сравнительной диагностической эффективности иммуноферментных тест-систем (ИФТС) для выявления противотуберкулезных антител в сыворотке крови «ИФА-ТУБ», «АТ-Туб-Бест» и набора «ИФА-БОВИТУБК-ТУБАТАГ» для определения микобактериальных антигенов и их комплексов с антителами у больных туберкулезом легких.

Определение специфических противотуберкулезных антител, иммунных комплексов и микобактериальных антигенов позволяет повысить чувствительность иммунодиагностики туберкулеза (79,2-100%).

Исследование сывороток крови клинически здоровых лиц показало высокую специфичность (90-100 %) испытанных иммуноферментных тест-систем.

#### Ключевые слова

Маркеры туберкулезной инфекции, противотуберкулезные антитела, антигены возбудителя туберкулеза, иммуноферментные тест-системы.

Для лабораторной диагностики туберкулеза апробировались многие серологические методы, но лишь с разработкой и внедрением в широкую клиническую практику иммуноферментного анализа (ИФА), отличающегося высокой чувствительностью, позволяющего автоматизировать и стандартизировать постановку реакции и учет результатов, появилась возможность проводить раннюю иммунодиагностику за-

#### Summary

Outcomes of comparative efficacy of revealing of markers of a tubercular infection contamination with utilization tests - systems ELISA for revealing antitubercular anti-bodies and for revealing микобактериальных антигенов and their complexes at ill a pulmonary tuberculosis are introduced. It is revealed, that at ill a pulmonary tuberculosis in the fissile phase it is necessary to define a level of cell-bound immune complexes and микобактериальных антигенов. Simultaneous definition of specific antitubercular anti-bodies, cell-bound immune complexes and микобактериальных антигенов allows to increase sensitivity of an immunodiagnosis of a tuberculosis up to 79,2-100 %.

#### Key words

Markers of a tubercular infection contamination, antitubercular anti-bodies, antigens of the originator of a tuberculosis, ELISA tests - systems.

болевания. Достоинством метода является наиболее выраженное, в сравнении с другими серологическими реакциями соответствие требованиям, предъявляемым к методикам массовых обследований. Разработанные для этой цели иммуноферментные тест системы (ИФТС) предназначены для диагностических и сероэпидемиологических исследований, а также для оценки динамики титров противотуберкулезных ан-

тител (ПТАТ), в том числе для оценки эффективности химиотерапии [1, 2].

Считается, что при раннем выявлении туберкулеза любой локализации метод выявления ПТАТ в ИФА наиболее эффективнее (выявляемость составляет 0,48 на 1000 обследованных лиц), чем флюорография, микроскопия мазков мокроты, бактериологический посев и туберкулинодиагностика [3].

Вместе с тем чувствительность коммерческих наборов в значительной степени зависит от используемых антигенов и ряда других факторов. В качестве антигена применяли разнообразные продукты *Mycobacterium tuberculosis*: культуральные фильтраты, ППД туберкулин, соникаты бактериальной массы, клеточные экстракты, гликолипиды, ЛАМ (липоарабиноманнан), частично или полностью очищенные индивидуальные антигены [4, 5].

Большие надежды возлагались на применение высокоочищенных антигенов микобактерий МРТ64, МРВ70, МРТ59, ESAT6. В настоящее время становится понятным, что из-за существенных различий в индивидуальном иммунном ответе очищенные антигены, даже в виде «коктейля», не обеспечивают достаточно высокой чувствительности. Поэтому для выявления ПТАТ предпочтение отдается комплексным препаратам на основе иммунодоминантных антигенов [6, 7].

Как правило, чувствительность ИФА при выявлении ПТАТ у больных туберкулезом варьирует в довольно широком диапазоне, и составляет 30 - 86%, но достаточно часто она не превышает 17-37%, что связано не только с особенностями течения туберкулезной инфекции и генетическими особенностями иммунного ответа, но и с тем, что при интенсивном синтезе микобактериальных антигенов, антитела могут циркулировать в составе иммунных комплексов [8, 9].

При активизации туберкулезной инфекции отмечается интенсивный синтез микобактериальных антигенов, циркулирующих в крови, связываясь с ПТАТ, они образуют иммунные комплексы, что снижает чувствительность методов ИФА, основанных на выявлении ПТАТ. Вероятно, что определение уровня микобактериальных антигенов и иммунных комплексов может не только повысить чувствительность ИФА диагностики туберкулеза, но и оценить тяжесть инфекции.

Целью работы является сравнение диагностической эффективности тест-систем «ИФА-

ТУБ» и «АТ-Туб-Бест» для выявления в сыворотке крови ПТАТ, и корреляция их результатов с уровнем циркулирующих микобактериальных антигенов и их комплексов с антителами, выявляемыми тест-системой «ИФА-БОВИТУБК-ТУБАТАГ».

### Материал и методы

В работе использовали иммуноферментные тест-системы для определения противотуберкулезных антител в сыворотке крови «ИФА-ТУБ» (г. Минск), «АТ-Туб-Бест» (г. Новосибирск) и для выявления микобактериальных антигенов и их комплексов с антителами «ИФА-БОВИТУБК-ТУБАТАГ» (г. Минск).

Иммуноферментный анализ проводили и интерпретировали в соответствии с инструкциями к наборам. Одновременно исследовали сыворотки крови 35 больных с инфильтративным туберкулезом, 5 больных с фиброзно-кавернозным туберкулезом, и 20 проб сыворотки крови клинически здоровых лиц.

Уровнем положительной реакции для тест-системы «ИФА-ТУБ» считали 0,237 ед. оптической плотности (ОП) и более положительной (+), сомнительной ( $\pm$ ) – 0,236 ед. ОП; для тест-системы «АТ-Туб-Бест» – 0,283 ед. ОП и более положительной (+), 0,260 ед. ОП – сомнительной ( $\pm$ ).

При постановке метода ИФА для выявления микобактериальных антигенов и их комплексов с антителами, на первом этапе исследуемые сыворотки разводили в обычном растворе (1:50) и с комплексом антигенов *M.tuberculosis* для выявления уровня ПТАТ, и их способности связываться с антигенами возбудителя.

На втором этапе исследуемые пробы смешивали с равным объемом кроличьих тест-антител к антигенам *M.tuberculosis* в ИФА определяли степень снижения оптической плотности в %. Отрицательным контролем служили тест-антитела, к которым добавляли равные объемы сывороток крови клинически здоровых доноров.

Положительные контроли были представлены тест-антителами, смешанными с антигенами *M.tuberculosis*. После инкубации смесей в течение часа при комнатной температуре их активность определяли в непрямом варианте ИФА по общепринятой методике, учитывая степень ингибиции по снижению оптической плотности. Процент ингибиции активности тест-антител – 45 % и более считали положительным (+).

## Результаты и обсуждение

Оценка специфичности ИФТС с использованием 20 сывороток практически здоровых лиц представлена в таблице 1.

Исследование сывороток крови клинически здоровых лиц показало, что 90-95 % проб дают отрицательные результаты при определении ПТАТ и 100% при определении антигенов. Это указывает на высокую специфичность испытанных иммуноферментных тест-систем.

Индивидуальные и обобщенные результаты исследования сывороток крови больных туберкулезом легких с использованием 3 тест-систем: «ИФА-ТУБ», «АТ-Туб-Бест» (для определения противотуберкулезных антител) и «ИФА-БОВИТУБК» (выявление микобактериальных антигенов и их комплексов с антителами) представлены в табл. 2 и 3.

В группе больных инфильтративным туберкулезом (БК+) чувствительность тест-системы «ИФА-ТУБ» была несколько выше (число положительных и сомнительных реакций составило 61,5%), чем тест-система «АТ-Туб-Бест» (число положительных и сомнительных реакций составило 50%). Результаты определения ПТАТ в 66,7% случаев на обе тест-системы совпадали.

Такая же тенденция отмечалась и по другим группам больных туберкулезом. При инфильтративном туберкулезе (БК-) чувствительность обоих наборов была одинаковой, а при фиброзно-кавернозном туберкулезе (БК+) несколько большей у тест-системы «ИФА-ТУБ», соответственно 60 и 40%. Совпадение результатов ИФА составило 80%.

Таким образом, по диагностической эффективности выявления ПТАТ тест-системы «ИФА-ТУБ» и «АТ-Туб-Бест» существенно не различались. Вместе с тем необходимо признать, что у 40- 66% больных туберкулезом не удалось выявить диагностических уровней ПТАТ.

Более чувствительным маркером туберкулезной инфекции оказался уровень иммунных

комплексов и микобактериальных антигенов, определяемых с использованием тест-системы «ИФА-БОВИТУБК-ТУБАТАГ».

Чувствительность набора «ИФА-БОВИТУБК-ТУБАТАГ» составила в зависимости от группы больных туберкулезом 50-100%. Следует отметить, что позитивные результаты ИФА чаще были получены у больных с негативным или сомнительным результатом определения противотуберкулезных антител. Так, из 28 анализируемых случаев у 11 (39,3%) больных туберкулезом результаты иммуноферментного анализа с использованием тест-систем «ИФА-ТУБ» и «АТ-Туб-Бест» были отрицательными, а «ИФА-БОВИТУБК-ТУБАТАГ» - положительными.

Эти данные подтверждают предположение о том, что при интенсивном размножении в организме возбудителя туберкулеза большинство синтезируемых специфических антител связывается с микобактериальными антигенами и не определяется в ИФА. Поэтому, при тяжелом течении туберкулезной инфекции, особенно в начале заболевания, результативность серологических тестов, основанных на выявлении противотуберкулезных антител, как правило – низкая.

В целом одновременное определение ПТАТ, иммунных комплексов и антигенов с использованием отечественных наборов «ИФА-ТУБ» и «ИФА-БОВИТУБК», позволяет повысить чувствительность иммунодиагностики туберкулезной инфекции до 79,2-100%.

Таким образом, по частоте выявления ПТАТ тест-системы «ИФА-ТУБ» и «АТ-Туб-Бест» существенно не различались. Это подтверждает то, что отечественная тест-система по диагностической ценности достоверно не отличается от одной из лучших зарубежных тест-систем, используемых в медицинской практике.

Вместе с тем, необходимо признать, что у 40-66% больных у больных инфильтративным и

**Таблица 1**  
**Результаты определения специфичности наборов в ИФА**

Набор реагентов для ИФА	Число проб	ИФА реагировало положительно	ИФА реагировало сомнительно	Специфичность, %
«ИФА-ТУБ»	20	0	2 (10%)	90
«Ат-Туб-Бест-стрип»	20	1 (5%)	1 (5%)	90
«ИФА-БОВИТУБК-ТУБАТАГ»	20	0	0	100

Таблица 2

## Индивидуальные результаты исследования сыворотки крови больных туберкулезом в ИФА

«ИФА-ТУБ» оптическая плотность	«Ат-Туб-Бест»	«ИФА-БОВИТУБК» % ингибиции активности тест-антител
Диагноз: инфильтративный туберкулез, БК +		
0,178 –	0,179 –	-49% +
0,206 ±	0,164 –	-37% –
0,258 +	0,264 ±	-49% +
0,243 +	0,201 ±	-50% +
0,155 –	0,352 +	-72% +
0,242 +	0,181 –	-66% +
0,140 –	0,204 ±	-69% +
0,303 +	0,417 +	-78% +
0,213 ±	0,140 –	-77% +
0,137 –	0,172 –	-21% –
0,341 +	0,268 +	-64% +
0,107 –	0,108 –	-64% +
0,085 –	0,101 –	-25% –
0,222 ±	0,170 –	-1% –
0,169 –	0,109 –	-12% –
0,329 +	0,766 +	-45% +
0,210 ±	0,149 –	0%
0,129 –	0,123 –	-45% +
0,242 +	0,140 –	-35% –
0,292 +	0,232 +	-30% –
0,359 +	0,397 +	-30% –
0,162 –	0,173 –	-50% +
0,203 ±	0,284 +	-37% –
0,145 –	0,157 –	-67% +
0,345 +	0,402 +	не исследована
0,208 ±	0,270 ±	не исследована
Диагноз: инфильтративный туберкулез, БК-		
0,240 +	0,150 –	-18% –
0,180 –	0,252 +	-45% +
Диагноз: фиброзно-кавернозный туберкулез, БК+		
0,173 –	0,156 –	-69% +
0,150 –	0,138 –	-59% +
0,360 +	0,490 +	не исследована
0,237 +	0,243 ±	не исследована
0,298 +	0,676 +	не исследована

**Таблица 3**  
**Сравнительная эффективность тест-систем для выявления маркеров туберкулезной инфекции**

Число проб	«ИФА-ТУБ» положительно /сомнительно	«АТ-Туб-Бест» положительно /сомнительно	Совпадения результатов определения антител	«ИФА-БО- ВИТУБК- ТУБАТАГ»	«ИФА-ТУБ»+ «ИФА- БОВИТУБК- ТУБАТАГ»
Инfiltrативный, БК+					
26	10+ (38,5%) 6± (23%)	9+ (34,6%) 4± (15,4%)	18 + (66,7%)	14+ (56%)	19+ (79,2%)
Инfiltrативный, БК-					
2	1+(50%)	1+(50%)		1+ (50%)	2+ (100%)
Фиброзно-кавернозный, БК+					
5	3+ (60%)	2+ (40%) 1 (20%)	5+ (100%)	2 +(100%)	5+ (100%)

фиброзно-кавернозным туберкулезом оба набора не выявляли диагностических уровней ПТАТ. В целом это укладывается в ранее установленные параметры чувствительности 40-86%, которые превышали показатели зарубежных наборов (17-37%).

Известно, что при регистрации иммунного ответа при туберкулезе необходимо учитывать феномен образования и циркуляции иммунных комплексов (ЦИК) и антигенов микобактерий трудно поддающихся деградации. Уровень циркулирующих иммунных комплексов может быть связан с клинической формой и фазой заболевания. Высокое содержание ЦИК и антигенов характерно для инfiltrативно-диссеминированных процессов, особенно в фазе распада, а также при фиброзно-кавернозном туберкулезе.

Полученные результаты подтвердили влияние циркуляции антигенов и их комплексов с антителами на результативность выявления ПТАТ в ИФА. Данные литературы свидетельствуют, что выделение и диссоциация иммунных комплексов из сывороток крови серонегативных лиц повышает чувствительность серологической диагностики до 95,6%. Действительно наиболее чувствительным маркером туберкулезной инфекции оказался уровень иммунных комплексов и микобактериальных антигенов, определяемых набором «ИФА - БОВИТУБК-ТУБАТАГ».

Таким образом, оценивая возможности ИФА - диагностики при туберкулезе, можно признать ее полезность, и во многих случаях даже незаменимость. Необходимо различать два аспекта иммуноферментной диагностики

туберкулеза: скрининг с «отбором» лиц с подозрением на туберкулез для последующего углубленного обследования, и дифференциальная диагностика туберкулеза и других заболеваний. Для проведения скрининговых сероэпидемиологических исследований необходимы тест-системы с высокой чувствительностью, меньшие требования предъявляются к специфичности. Для дифференциальной диагностики туберкулезной инфекции важна абсолютная специфичность. Наши исследования показали, что одновременное использование отечественных наборов ИФА-ТУБ и «ИФА-БОВИТУБК-ТУБАТАГ» позволяет не только решить проблему скрининга, но и дифференциальной диагностики.

### Выводы

1. Иммуноферментные тест-системы для определения противотуберкулезных антител «ИФА-ТУБ» и «АТ-Туб-Бест» обладают примерно одинаковой специфичностью (90-95%) и чувствительностью (34,6-50%), и в 66,7-80% случаев дают идентичные результаты.

2. Уровень иммунных комплексов и микобактериальных антигенов, определяемых набором «ИФА-БОВИТУБК» является более чувствительным маркером туберкулезной инфекции (50-100%).

3. Одновременное определение противотуберкулезных антител, иммунных комплексов и антигенов с использованием отечественных наборов «ИФА-ТУБ» и «ИФА-БОВИТУБК» позволяет поднять чувствительность диагностики туберкулеза (79,2-100%).

## Литература

1. Авербах М.М., Р.Ю.Романова, Инсаков А.Б. Циркулирующие иммунные комплексы и бактериальные антигены в крови больных туберкулезом легких. Микробиология. 1998; 12: 91-94.
2. Хонина Н.А. Особенности иммунитета у больных с различными формами туберкулеза легких. Пробл. туберкулеза. 2000; 1: 30-32.
3. Карпов А.В. Сравнительная эффективность раннего выявления туберкулеза иммунологическими методами. Туберкулез. 2000; 3: 1-2.
4. Стаханов В.А. Клиническое значение иммунологических методов исследования при туберкулезе. Рос. мед. журн..2001; 2: 26-28.
5. Яковлева Л.Ф., Лысенко А.П., Суркова Л.К. и др. Иммунный спектр сыворотки крови при различных формах туберкулеза и его влияние на результативность серологической диагностики. Иммунопатология, аллергол., инфектолог. 2004; 2: 129-132.
6. Яковлева Л.Ф., Федорович С.В., Лысенко А.П. Диагностикумы для выявления специфических антител к возбудителю туберкулеза. Здоровье и окружающая среда: сб. науч. тр. ГУ «Респ.науч.-практ. центр гигиены». 2005; Вып. 5: 599-603.
7. Waters W.R. et al. Antigen recognition by serum antibodies in white-tailed deer experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2004; 11: 849-855.
8. Julian E. Comparison of antibody responses to a potential combination of specific glycolipids and proteins for test sensitivity improvement in tuberculosis serodiagnosis. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2004; Vol. 1; №11: 70-76.
9. Fujita Y. Clinical evaluation of serodiagnosis of active tuberculosis by multiple-antigen ELISA using lipids from *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo. Clin. Chem. Lab. Med. 2005; Vol. 11; № 43: 1253-1262.