



*На правах рукописи*

**СТАХЕЕВА Виктория Владимировна**

**ОПТИМИЗАЦИЯ КЛИНИКО-  
ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ И  
ОЗДОРОВЛЕНИЕ ДЕТЕЙ ДОШКОЛЬНОГО  
ВОЗРАСТА ИЗ ГРУПП РИСКА  
ПО ТУБЕРКУЛЁЗУ**

**14.01.08 – педиатрия**

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

**27 ОКТ 2011**

**Астрахань – 2011**

**Работа выполнена в ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития РФ**

**Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор**

**Башкина Ольга Александровна**

**Научный консультант: доктор медицинских наук, профессор**

**Стрельцова Елена Николаевна**

**Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор**

**Ледяев Михаил Яковлевич**

**доктор медицинских наук, профессор**

**Сироткин Евгений Александрович**

**Ведущая организация (предприятие): ГОУ ВПО «Ставропольская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации**

Защита состоится «*17*» *ноября* 2011 г. в *10<sup>00</sup>* часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 208.005.01 при ГБОУ ВПО АГМА Минздравсоцразвития РФ (414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, 121)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития РФ

Автореферат разослан «*14*» *октября* 2011 г.

Учёный секретарь совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 208.005, кандидат медицинских наук, доцент

Заклякова Л.В.



## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования

Туберкулёз продолжает оставаться серьёзной медицинской и социальной проблемой во всём мире, несмотря на значительные успехи в химиотерапии и расширение возможностей специфической диагностики. С начала XXI отмечается значительное увеличение заболеваемости туберкулёзом в России как среди взрослого населения, так и среди детей, особенно в возрасте от 3 до 6 лет (Шилова М.В., Миляев А.А., 2003). При этом болеют туберкулёзом в подавляющем большинстве случаев дети из групп риска, а именно часто болеющие дети (ЧБД), дети с хронической неспецифической бронхолёгочной патологией (ХНЗЛ), дети с «виражом» туберкулиновых реакций (VIA), гиперергическими реакциями на туберкулин (VIB) и инфицированные МБТ с нарастанием чувствительности к туберкулину (VIB), контактные с больными туберкулёзом (IV) и др. (Аксёнова К.И., 2000; Амосова, 2007; Кузьмина И.К., Губкина М.Ф., 2009).

Рост заболевания туберкулёзом в группах риска привёл к тому, что число впервые инфицированных МБТ детей (с латентной туберкулёзной инфекцией) увеличилось за последнее десятилетие более, чем в 2 раза (Король О.И., Лозовская М.Э., 2005; Аксёнова В.А., 2009). Под влиянием иммунной системы человека микобактерии туберкулёза могут изменять свои биологические свойства, полностью не элиминируются из организма и персистируют, переходя из активной формы в неактивную, создавая при определённых условиях угрозу для развития заболевания (Кучеров А.Л., Ильичёва Е.Ю., 2001; Сиренко И.А., 2006). Изучение механизмов иммунологической реактивности инфицированных МБТ детей, а также эпидемиологических, медико-биологических и социальных факторов риска, под действием которых может возникнуть состояние латентного микробизма (Каграманов А.И., 1955; Мейснер А.Ф., Овсянкина Е.С., 2008), является весьма перспективным и открывает возможности для раннего выявления детей, угрожаемых по туберкулёзу, что имеет решающее значение в педиатрической практике.

Известно, что самую первую доиммунную защитную реакцию при развитии патологического процесса осуществляют факторы естественной резистентности, к числу которых относится лакто-

феррин. Этот белок острой фазы достаточно давно привлекает внимание исследователей, поскольку доказано его участие в иммунных и воспалительных реакциях (Трубников Г.А., 2000; Николаев А.А., Сухарев А.Е., 2006, 2009; Hara K., 2002; Belyars L., 2004; Legrand D., 2004). Особое место в каскаде иммунологических и патофизиологических реакций принадлежит медиаторам иммунного ответа - цитокинам, выполняющим различные иммунорегуляторные функции (Хаитов Р.М., 2001; Симбирцев А.С., 2002; Воробьев А.А., 2006; Buck R.H., 2002; Jognson J.L., 2003).

Однако, изучение особенностей цитокиновой регуляции в совокупности с факторами естественной резистентности у детей из групп риска ранее не проводилось. В то же время, определение уровня цитокинов, а именно ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10 в комплексе с лактоферрином принципиально значимо для уточнения важнейших звеньев патогенеза туберкулёза как в преморбидном периоде, так и при его прогрессирующем течении. При этом выявление дисрегуляторных иммунных изменений наряду с объективной оценкой факторов риска позволит улучшить не только диагностические, но и прогностические возможности педиатра при выборе оптимальных методов реабилитации детей, угрожаемых по туберкулёзу.

### **Цель исследования**

Определение диагностического и прогностического значения комплекса бактериологических и серологических исследований с оценкой цитокинового статуса и состояния естественной резистентности для оздоровления детей дошкольного возраста из групп риска по туберкулёзу.

### **Задачи исследования**

1. Выявить социальные, медико-биологические, эпидемиологические факторы риска развития туберкулёзной инфекции и провести их комплексную оценку у детей Астраханской области.
2. Изучить возможности специфической диагностики туберкулёзной инфекции у детей из групп риска в современных условиях.
3. Определить патогенетическую роль носительства условно-патогенной флоры у детей из групп риска по туберкулёзу.
4. Изучить динамику уровня лактоферрина в секрете ротовой полости и сыворотке крови, как показателя состояния естественной резистентности, у детей, угрожаемых по туберкулёзу.

5. Уточнить диагностическое и прогностическое значение определения уровня ИЛ-6, -8, -10 у детей, угрожаемых по туберкулёзу.
6. Оценить клинико-иммунологическую эффективность применения препарата рекомбинантного ИЛ-2 (Ронколейкина®) у детей из групп риска по туберкулёзу.

### **Научная новизна**

Впервые посредством углублённого статистического анализа анкетных данных проведена комплексная оценка влияния эпидемиологических, социальных и медико-биологических факторов на риск возникновения заболевания и инфицирования микобактериями туберкулёза у детей дошкольного возраста.

На основании сравнительной характеристики возможностей специфической диагностики туберкулёза у детей из групп риска впервые определена информативность метода иммуноблоттинга в диагностике туберкулёзной инфекции.

Впервые выявлено, что носительство стафилококка у детей с рецидивирующей респираторной патологией сопровождается умеренным ростом уровня ИЛ-6 и -8 на фоне снижения факторов естественной резистентности, что способствует инфицированию МБТ.

Уточнено состояние местного иммунитета у детей дошкольного возраста, как в группах риска, так и у больных туберкулёзом, что позволило рассматривать определение уровня лактоферрина, как дополнительный критерий для прогнозирования риска развития туберкулёза.

Установлено, что особенностью цитокинового статуса при инфицировании МБТ является повышение экспрессии ИЛ-6, -8 и увеличение концентрации сывороточного лактоферрина, в то время как туберкулёз внутригрудных лимфоузлов характеризуется высокими уровнями ИЛ-6, -8 и -10 в сочетании с выраженной гиперлактоферринемией.

Впервые была произведена оценка клинико-иммунологической эффективности применения препарата рекомбинантного ИЛ-2 в оздоровлении детей из групп риска по туберкулёзу.

Полученные данные позволили предложить алгоритм диагностики и оздоровления детей из групп риска по туберкулёзу, и впервые провести иммуномониторинг с иммунопрофилактикой среди таких детей в рамках ДООУ.

### **Практическая значимость работы**

На основании полученных данных разработаны критерии оценки влияния нарушений местного иммунитета и иммунорегуляторных нарушений на риск инфицирования микобактериями туберкулёза и определены показания для проведения адресной иммунокорректирующей терапии, которая будет способствовать повышению эффективности превентивного лечения детей из групп риска и санации бактерионосительства условно-патогенной флоры.

Выявление прогностически значимых факторов риска с последующей комплексной оценкой даёт основание выделить среди детей группы, угрожаемых по инфицированию и заболеванию туберкулёзом, на уровне ДООУ, СОШ, ОСРЦ, что позволит врачам первичного звена дифференцированно подходить к выбору методов обследования и лечения.

Использование предлагаемых бактериологических и серологических методик в комплексе с оценкой состояния естественной резистентности и цитокинового спектра расширит возможности ранней диагностики туберкулёза.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Комплексная оценка факторов риска, выявленных при углублённом анкетном опросе, составляет основу прогноза для возникновения туберкулёзной инфекции у детей дошкольного возраста из групп риска.
2. Метод иммуноблоттинга за счёт высокой специфичности и чувствительности теста дополняет современный арсенал методов ранней диагностики туберкулёза и компенсирует недостатки туберкулинодиагностики.
3. Персистенция условно патогенной флоры, среди которой доминирует стафилококк (60%), приводит к снижению неспецифической резистентности у «часто болеющих» детей, что повышает риск их инфицирования МБТ.
4. Определение уровня секреторного лактоферрина, как индикатора состояния факторов неспецифической резистентности, позволяет выявить нарушения местного иммунитета, способствующие развитию туберкулёзной инфекции у детей дошкольного возраста из групп риска по туберкулёзу.
5. Иммунорегуляторные нарушения при туберкулёзной инфекции

проявляются гиперпродукцией ИЛ-6, -8, -10 на фоне гиперлактоферринемии.

6. Включение в схемы оздоровления детей из групп риска иммунокорректирующего препарата рекомбинантного ИЛ-2 повышает эффективность противотуберкулёзной терапии и способствует санации стафилококкового бактерионосительства.

### **Апробация работы и публикации**

Основные положения диссертации доложены на V Всероссийской университетской научно-практической конференции молодых учёных и студентов по медицине (Тула, 2006), на 86-й итоговой научно-практической конференции сотрудников АГМА и врачей города и области по актуальным проблемам медицинской науки и биологии (Астрахань, 2009), в рамках XVI Российского национального конгресса «Человек и лекарство» (Москва, 2006, 2008) и XIV Международного конгресса по реабилитации в медицине и иммунореабилитации (Тель-Авив, Израиль, 2009), а также Пироговской конференции студентов и молодых учёных (Москва, 2010).

По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, в том числе 1 в рецензируемой научном журнале, рекомендованном ВАК для публикации результатов диссертационного исследования.

### **Связь с планом научных исследований**

Работа проводилась по плану НИР ГБОУ ВПО «АГМА» Минздравсоцразвития РФ как фрагмент комплексной НИР «Клинико-патогенетическое значение вирусных и бактериальных инфекций при соматической патологии у детей и возможности иммунорекоррекции» (№ государственной регистрации 01200801769).

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы (глава 1), описания материалов и методов исследования (глава 2), результатов исследования (главы 3, 4, 5, 6, 7), заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа изложена на 173 страницах машинописного текста, содержит 35 таблиц и 21 рисунок, 1 схему. Список литературы включает 252 работы, из них 167 - отечественных и 85 - зарубежных авторов. Материалы диссертации наглядно аргументированы 3 клиническими примерами.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы исследования

Материалом работы послужило наблюдение за 420 детьми в возрасте от 1 года до 9 лет. Основную группу составили 135 детей из групп риска по туберкулёзу, а именно 12 детей с гиперергическими реакциями Манту (VI Б), 26 детей с нарастанием чувствительности к туберкулину на 6 мм и более (VI В), 22 ребёнка с «выражом» туберкулиновых проб (VI А - РППТИ), 54 ребёнка с рецидивирующей респираторной патологией из группы «часто болеющих» (ЧБД), 21 ребёнок с бронхиальной астмой. Учитывались также дети, контактные из очагов туберкулёзной инфекции, не вакцинированные БЦЖ, без сформировавшегося рубчика от БЦЖ, имевшие маленькие рубчики (1-3мм) после вакцинации БЦЖ из числа вышеуказанных. В рамках контрольной группы нами рассматривались 230 условно здоровых детей из ДОУ и СОШ, а также 25 детей, поступавших на вакцинацию в ЛПУ. В качестве группы сравнения были взяты 30 детей с туберкулёзом внутригрудных лимфоузлов (ТВГЛУ), подтверждённого клинико-рентгенологическими методами.

Исследование проводилось с 2003 по 2009 год в 3 этапа:

1. Скрининговые исследования среди 255 условно здоровых детей из групп риска по туберкулёзу, пребывавших в ДОУ и СОШ города Астрахани с последующим мониторингом состояния местного иммунитета у детей в течение 1 года.
2. Клинические исследования среди 135 детей из групп риска по туберкулёзу и 30 больных туберкулёзом детей, госпитализированных в аллергологическое отделение ГУЗ «Областная детская клиническая больница им. Н.Н. Силищевой», пульмонологическое отделение МУЗ II ГДБ и санаторные отделения ГУЗ «Областной противотуберкулёзный диспансер» (ОПТД филиал для детей).
3. Оздоровление с иммунокоррекцией у 57 детей из групп риска и больных туберкулёзом из числа ранее обследованных на I и II этапах исследования с наблюдением в течение 6 месяцев.

Базовое обследование детей осуществлялось в соответствии с временными отраслевыми стандартами объема медицинской помощи детям (приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 151).

Всем больным проводились общепринятые лабораторные и инструментальные методы исследования: общий анализ крови, мочи, кала, рентгенография органов грудной клетки. В ГУЗ ОПТД наряду с туберкулинодиагностикой (проба Манту) дополнительно проводилась постановка ДИАСКИНТЕСТА<sup>®</sup>, а также томография органов грудной клетки, микроскопическое и бактериологическое исследование мокроты на МБТ.

Для расшифровки природы заболевания у часто болеющих детей проводилось определение микробиоценоза верхних дыхательных путей посредством посева мазка из носоглотки. Заключение о резидентном или транзитном носительстве стафилококков делали по антилизоцимной активности (АЛА) выделенных штаммов по методике Бухарина О.В. (1997).

Постановка серологических реакций для определения антител к вирусам, внеклеточным патогенам, в сыворотке крови осуществлялась методами ИФА, РПИФ, а также антител к МБТ методом иммуноблоттинга с применением набора SD BIOLINE Rapid TB.

Диагностика иммунорегуляторных нарушений проводилась путём определения уровня ИЛ-6, -8, -10 методом ИФА с использованием коммерческих тест систем ООО «Цитокин» (г. Санкт-Петербург) и результат выражали в пг/мл.

Состояние факторов естественной резистентности оценивалось: 1) по уровню бактерицидной активности сыворотки крови (БАСК), определяемой фотонепелометрическим методом в модификации О.В.Шепелева (1997) при длине волны 590 нм, уровень выражали в процентах; 2) путём измерения концентрации секреторного и сывороточного лактоферрина методом радиальной иммунодиффузии по Манчини, результат выражали в мкг/мл.

Исследование иммунного статуса детей проводилось с использованием стандартных и унифицированных тестов I уровня в соответствии с методическими рекомендациями Института иммунологии (Петров Р.В. с соавт., 1992).

Статистическая обработка полученных результатов исследования проводилась общепринятыми методами вариационной статистики. При правильном распределении значений ряда использовали критерий Стьюдента (t) с уровнем значимости, обеспечивающим вероятность ошибки  $p < 0,05$  для оценки достоверности различий. Кроме того, осуществлялось прогнозирование риска инфицирования в контрольной группе и риска заболевания туберкулёзом

в основной группе с помощью методики комплексной оценки влияния наиболее значимых факторов риска, модифицированной на основе способа оценки эпидемической опасности очага туберкулёзной инфекции О.В. Касимцевой (2008). При этом оценка риска развития туберкулёза производилась нами с помощью показателя опасности заболевания туберкулёзом (ПО), как отношения частоты встречаемости конкретного фактора риска в контрольной группе к частоте встречаемости в группе здоровых детей. Для оценки риска инфицирования МБТ нами предложен показатель угрозы инфицирования МБТ (ПУ), который определялся из соотношения частоты встречаемости конкретного фактора риска в основной группе к частоте встречаемости в группе здоровых детей.

Предложенная методика включала следующие этапы:

1. Сбор анамнеза, клиническое наблюдение, а также выявление с помощью детализированной анкеты-опросника факторов риска заболевания туберкулёзом (или инфицирования МБТ) и факторов протекции, составляющих основу прогноза.
2. Вычисление значений комплексных показателей опасности заболевания (ПО) туберкулёзом или угрозы инфицирования (ПУ) по формуле:  $(П_1-1)+(П_2-1)+\dots+(П_n-1)$ , где  $П_{1,2}$  - достоверные значения ПО и ПУ для конкретных факторов,  $n$  – число выявленных у ребёнка факторов риска.
3. Сравнение полученных значений комплексных ПО и ПУ с контрольными и определение степени опасности заболевания туберкулёзом или угрозы инфицирования у конкретного ребёнка.

### Результаты исследования

Проведённый анализ возрастного состава обследованных показал, что во всех группах преобладали дети дошкольного возраста. Значимых гендерных различий нами не выявлено, количество мальчиков и девочек было примерно одинаковым (52,5% и 47,5% соответственно).

При изучении медико-социальных аспектов формирования групп риска нами выявлены наиболее значимые социальные факторы риска: асоциальный образ жизни родителей (алкоголизм и наркомания), пребывание их в местах заключения, беспризорность детей, миграция и безработица в семьях.

Немаловажное значение имело воспитание ребёнка в неполных и малообеспеченных семьях. Такие дети чаще всего не посеща-

ли ДООУ и принадлежали к группе «неорганизованных», при этом страдал контроль качества вакцинации, адекватное наблюдение за состоянием здоровья ребёнка, отсутствовали регулярное оздоровление и проведение витаминизации в период сезонного подъёма заболеваемости ОРЗ.

Наряду с социальными факторами риска развития туберкулезной инфекции установлена роль медико-биологических факторов, особенно на ранних этапах развития ребёнка. Это пре- и перинатальные факторы (отягощенный акушерско-соматический анамнез матери и недоношенность), искусственное вскармливание, ОРЗ, пневмонии и аллергические реакции на 1 году жизни. Не утратила актуальности проблема частого, как правило, бесконтрольного применения антибиотиков опрошенными родителями.

Значимость информационного фактора в группах респондентов обуславливает необходимость повышения требований к качеству санитарно-просветительной работы, определявшей высокий уровень знаний о туберкулезе у родителей.

При сопоставлении полученных комплексных показателей (табл. 1) выделена группа детей с рецидивирующей респираторной патологией и аллергическими заболеваниями, которые подвержены как риску развития туберкулеза, так и инфицирования МБТ.

При анализе результатов туберкулинодиагностики по среднему размеру папулы выявлена низкая специфичность реакции Манту, которая не всегда позволяет отличить, с одной стороны, поствакцинальную аллергию от инфекционной, а с другой стороны, туберкулез в активной фазе и в период разрешения процесса. При этом была доказана информативность ДИАСКИНТЕСТА® как при дифференциальной диагностике поствакцинальной и инфекционной аллергии, так и при активном туберкулезе.

При микроскопии мокроты у всех обследованных с ТВГЛУ при наличии рентгенологических изменений в лимфоузлах микобактерию туберкулеза обнаружить не удалось, и данные клинические случаи рассматривались нами как «абациллярный туберкулез». В связи с этим для подтверждения диагноза туберкулеза было оправдано использование иммуноблоттинга как высокочувствительного метода качественного определения антител к МБТ в сыворотке крови. Применение иммуноблоттинга позволило выявить туберкулезный процесс в 27,3% случаев у детей из групп риска. Диагностическая чувствительность теста у больных туберкулезом

составила 88,9%, а у детей контактных по туберкулёзу - 66,7%.

Таблица 1

Комплексные показатели опасности и угрозы  
неспецифических факторов риска

Неспецифические факторы риска	ПО	ПУ
<i>СОЦИАЛЬНЫЕ</i>		
Асоциальный образ жизни родителей	21,3**	18***
Курение родителей	1,6*	1,3*
Пребывание родителей в местах заключения	25,4**	5,6*
Безработица в семьях	11,5***	6,4***
Миграция семей	13,6***	9,1***
Малообеспеченность семей	7,4***	5,3***
Неполная семья	4,2**	2,3**
Плохие бытовые условия	2*	1,8**
«Неорганизованные» дети	8,5***	4,7***
Беспризорность детей	29,6***	17**
<i>МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ</i>		
Вакцинация ребёнка вне календаря прививок	4**	2,3*
Частое применение антибиотиков у ребёнка	3,6**	2**
Пре- и перинатальные факторы	2,3*	1,9**
Искусственное вскармливание ребёнка	4,2**	3,9**
Грудное вскармливание ребёнка до 6 месяцев	2*	1,5*
ОРЗ, пневмония на 1 году жизни ребёнка	1,6*	2,2***
Аллергические реакции на 1 году жизни ребёнка	2,3**	3,7***
Частые эпизоды ОРЗ (более 6 раз в год) у ребёнка	3,4**	3**
Аллергические заболевания и реакции у ребёнка	5,1***	4,7***
Заболевания ВДП и ЛОР-органов у ребёнка	6,8***	6,3***
Отсутствие оздоровления и витаминизации	1,6**	1,3**
Нерациональное питание ребёнка	9,8***	6***
<i>ИНФОРМАЦИОННЫЙ</i>		
Низкий уровень знаний о туберкулёзе родителей	2**	1,7**

Примечание: \*-  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$  (достоверность различий в частоте встречаемости данных факторов риска в группе сравнения (ПО) и частоте их встречаемости в основной (ПУ) и контрольной группах)

По данным микробиологического обследования у «часто болеющих» детей в 65,7% случаев выявлялась неспецифическая бактериальная флора. В 60% регистрировалось носительство стафилококков с преобладанием резидентных носителей *Staphylococcus epidermidis* в 63,6% и *Staphylococcus aureus* в 60% случаев.

Наличие АЛА у стафилококков ( $5,94 \pm 1,15$  мкг/мл) обуславливало угнетение факторов естественной резистентности (снижение уров-

ня секреторного Лф в 1,2 раза, сывороточного Лф в 1,5 раза и БАСК – в 7 раз) и способствовало их персистенции и формированию вторичного дисбиоза слизистых оболочек ВДП, как наиболее значимого экологического локуса, представляющего собой входные ворота для туберкулёзной инфекции. Вместе с тем при рецидивирующих респираторных заболеваниях с отсутствием бактерионосительства концентрация секреторного и сывороточного Лф повышалась в 1,3 раза от нормы, а уровень БАСК – в 1,2 раза.

Кроме того, нами выявлена прямая корреляционная связь средней силы ( $r=0,53$ ,  $p<0,05$ ) между уровнем сывороточного лактоферрина и БАСК у детей с носительством стафилококка. Как показал анализ взаимосвязи между уровнем Лф в сыворотке и секрете ротовой полости, отмечается прямая связь между уровнем сывороточного и секреторного Лф при туберкулёзе внутригрудных лимфоузлов ( $r=0,90$ ), в группах риска ( $r=0,81$ ), а также у часто болеющих детей ( $r=0,77$ ), что подтверждало информативность данных показателей при оценке состояния естественной резистентности как в группах риска, так и у больных туберкулёзом ( $p<0,01$ ).

При анализе показателей цитокинового спектра выявлена гиперпродукция ИЛ-6, -8 и -10 при ТВГЛУ и в группах риска, но с меньшим диапазоном колебаний. Уровень ИЛ-10 имел тенденцию к нарастанию, что свидетельствовало об активации гуморального звена иммунитета, и сопровождалось, согласно данным иммунограмм, ростом уровня иммуноглобулинов классов А, G, M. В то же время, значительный скачок данного показателя (в 10 и более раз) при ТВГЛУ мог говорить о развитии иммунного ответа за счет  $Th_2$ , что является неблагоприятным прогностическим признаком при туберкулёзе (Елькин А.В., Арчакова Л.И., Басек Т.С. и др., 2008). Увеличение экспрессии ИЛ-6 наблюдалось как у «часто болеющих» детей, так и на ранних этапах развития туберкулёзной инфекции вплоть до максимальных уровней при ТВГЛУ. Диапазон колебаний ИЛ-8 в группах риска и ТВГЛУ указывал на уровень сенсibilизации к МБТ. Поскольку ИЛ-8 и ИЛ-6 индуцируют высвобождение нейтрофилами Лф (Дранник Г.Н., 2003; Намазова Л.С., 2000), высокие уровни сывороточного Лф при ТВГЛУ и в группах риска могли быть обусловлены гиперпродукцией данных провоспалительных цитокинов, что демонстрирует табл. 2.

Несмотря на неоднородность цитокинового ответа, а также разброс и ассиметричный характер распределения значений факто-

ров естественной резистентности в группах риска и при ТВГЛУ, по данным иммунограмм, развитие туберкулёзной инфекции характеризовалось превалированием Th<sub>1</sub> иммунного ответа или смешанным Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub> типом, с дефектами первичного ответа (снижение уровня иммуноглобулинов класса М) и фагоцитарного звена (снижение КАФ при высоком проценте фагоцитоза).

Таблица 2

Сравнительная характеристика уровня цитокинов (пг/мл) и лактоферрина (мкг/мл) у больных туберкулёзом и в группах риска

Группы обследованных детей	Средние концентрации лактоферрина		Средние уровни цитокинов в сыворотке крови		
	в секрете ротовой полости	в сыворотке крови	ИЛ-6	ИЛ-8	ИЛ-10
ТВГЛУ	9,5**	14,8**	36,3**	132,5**	89,5**
VI A	2,2	9,6**	19,9**	57,3**	6,8
VI Б	1,8*	11**	6,8	106,3**	5,7
VI В	8,7**	6,3**	11,7*	9,9*	6,5
ЧБД	6,8*	3,8	9,3*	14,4**	6,7
Контрольная	4,75	2,65	5,4	5,5	5,3

\*\*p<0,01 статистическая значимость различий с контрольными показателями

\*p<0,05 статистическая значимость различий с контрольными показателями

Результаты мониторинга нарушений местного иммунитета у детей из основной, контрольной групп и группы сравнения позволили рассматривать лактоферрин как индикатор факторов естественной резистентности и классифицировать состояния местной защиты следующим образом:

1. Напряжённость местного иммунитета - увеличение концентрации Лф в 1,5 –3 раза от возрастной нормы.
2. Активация местного иммунитета - повышение уровня Лф на 20 – 50% от возрастной нормы.
3. Удовлетворительное состояние местного иммунитета - соответствие уровня Лф возрастной норме.
4. Подавление местного иммунитета – снижение уровня Лф на 20 – 50% от возрастной нормы.
5. Резкое угнетение местного иммунитета – уменьшение концентрации Лф в 1,5 – 3 раза от возрастной нормы.

Если типы 2 и 3, зафиксированные, главным образом, в группе условно-здоровых детей (94%), рассматривались нами как варианты

нормы, то нарушения 1, 4, 5, встречались у больных туберкулёзом 83,2% случаев и в группах риска в 77,7% случаев.

Колебания сывороточного Лф были охарактеризованы нами как нормолактоферринемия, гиполактоферринемия и гиперлактоферринемия, при которой выделялись 3 степени отклонений:

- I степень – с повышением уровня Лф на 20 – 50% от нормы;
- II степень – повышением уровня Лф в 2-4 раза от нормы;
- III степень – повышением уровня Лф в 5-10 раз от нормы.

С учётом частоты встречаемости выявленных состояний местного иммунитета, изменений туберкулиновой чувствительности и нарушений микробиоценоза ВДП определены комплексные показатели специфических факторов риска, представленные ниже.

Таблица 3

Комплексные показатели опасности заболевания туберкулёзом и угрозы инфицирования МБТ специфических факторов риска

<i>1. Специфические факторы риска туберкулёза</i>	<i>ПО</i>
<i>ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ</i>	
Пребывание ребёнка в туберкулёзном очаге смерти	8,8*
Контакт ребёнка с больным туберкулёзом	42,7***
<i>МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ</i>	
Отсутствие вакцинации БЦЖ у ребёнка	7,5*
Маленький рубчик БЦЖ (1-3мм)	2,6*
Гиперергическая Манту	2,6*
РПТИ («вираж» туберкулиновых проб)	2,2**
<i>ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ</i>	
Напряжённость местного иммунитета	22,5***
Гиперлактоферринемия II	1,8*
Гиперлактоферринемия III	1,9**
<i>2. Специфические факторы риска инфицирования МБТ</i>	<i>ПУ</i>
<i>ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ</i>	
Контакт ребёнка с больным туберкулёзом	19***
<i>ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ</i>	
Напряжённость местного иммунитета	11,4*
Подавление местного иммунитета	13,4**
Угнетение местного иммунитета	17,2**
Гиполактоферринемия	2**
Гиперлактоферринемия I	2,1**
<i>МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ</i>	
Бактерионосительство <i>Staphylococcus aureus</i> у ребёнка	9,4***

Примечание: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$  (достоверность различий в частоте встречаемости данных факторов риска в группе сравнения (ПО) и частоте их встречаемости в основной (ПУ) и контрольной группах).

Для получения контрольных значений комплексных показателей опасности заболевания туберкулёзом и угрозы инфицирования проведён подсчёт их значений в основной, контрольной и группе сравнения, результат которых отражен в табл. 4.

Таблица 4

Контрольные значения комплексных показателей

Комплексные показатели	Группы		
	сравнения	основная	контрольная
ПО заболевания туберкулёзом	80,2±2,3	45,8±1,3	7,37±0,5
ПУ инфицирования МБТ	43,2±1,4	36,4±1,1	4,6±0,25

Диапазон значений комплексных показателей опасности и угрозы позволял определить степень опасности заболевания туберкулёзом. Контрольные значения комплексных ПО до 7 указывали на низкую опасность, с 7 до 44 – на умеренную опасность, с 44 до 78 – на высокую опасность, а выше 78 - на очень высокую опасность заболевания туберкулёзом. В то же время интервал значений комплексных показателей позволял оценить имеющуюся угрозу инфицирования МБТ. Контрольные значения комплексных ПУ до 4 свидетельствовали о незначительной угрозе, с 4 до 35 об умеренной угрозе, с 35 до 41 - о высокой угрозе, а выше 41 - об очень высокой угрозе инфицирования. На основании проведённой комплексной оценки факторов риска были выделена группа детей с высокой угрозой инфицирования МБТ (n=15) из числа условно здоровых, а также дети из основной группы наблюдения (n=34) с высокими показателями опасности заболевания туберкулёзом.

Выявленные отклонения факторов естественной резистентности, особенности микробиологической картины, иммунных и иммунорегуляторных нарушений, патогенетически обосновывали выбор местного воздействия препаратом рИЛ-2 (Ронколейкином®), с одной стороны, с целью иммунореабилитации в группе риска по туберкулёзу и у больных ТВГЛУ (n=8) из группы сравнения, а, с другой стороны, с целью иммунопрофилактики у детей с угрозой инфицирования МБТ в рамках ДОУ.

Ронколейкин® применялся по следующим схемам:

- в виде курса из 5 ингаляций на небулайзере через маску в дозе 125 тыс. МЕ для иммунореабилитации детей больных туберкулёзом и в группах риска по туберкулёзу в ЛПУ.

- в виде курса из 3 ингаляций на небулайзере через маску в дозе 125 тыс. МЕ для иммунопрофилактики детей, угрожаемых по инфицированию МБТ, в рамках ДООУ.

На фоне ингаляционного введения рекомбинантного ИЛ-2 отмечалась санация бактерионосителей транзиторного типа в 77,7% случаев. При этом элиминация наблюдалась в 45,5% случаев в отношении эпидермального стафилококка и в 40% случаев в отношении золотистого. Даже при отсутствии санации на фоне ингаляций отмечалась активация факторов естественной резистентности, что сопровождалась сменой антилизоцимной активности патогена ( $5,94 \pm 1,15$  мкг/мл) на лизоцимную ( $3,9 \pm 1,31$  мкг/мл). При рецидивирующих респираторных заболеваниях с отсутствием бактерионосительства при исходно напряжённом местном иммунитете наблюдалось снижение показателей в пределах нормы.



Рис. 1. Динамика уровня лактоферрина (мкг/мл) и цитокинов (пг/мл) на фоне ингаляционного введения рИЛ-2.

Кроме того, выявлены однонаправленные колебания цитокинов при туберкулёзе в виде снижения экспрессии ИЛ- 6, -8, -10 и уменьшения гиперлактоферринемии. В группах риска на фоне нормализации факторов естественной резистентности отмечалась асимметрия колебаний цитокинов: снижение продукции провоспалительных цитокинов сопровождалось повышением уровня противовоспалительного ИЛ-10 до умеренных цифр, что могло свидетельствовать об активации гуморального звена иммунитета компенсаторного типа.

В целом, при оценке эффективности иммунотерапии препаратом рИЛ-2 у детей из групп риска выявлено:

- санация бактерионосителей в 45,5% случаев - при носительстве *Staphylococcus epidermidis* и в 40% случаев - при носительстве *Staphylococcus aureus*;
- стабилизации туберкулиновой чувствительности в пределах 5-9 мм в 47,6% случаев и 2-4 мм в 38% случаев;
- активация (40%) и нормализация местного иммунитета (60%);
- снижение уровня ИЛ-6, -8, -10;
- снижение частоты повторных респираторных заболеваний в 76,2% случаев, уменьшение продолжительности рецидивов в 65,6% случаев в катамнезе.

Вместе с тем, на фоне лечения препаратом рекомбинантного интерлейкина-2 в 28,6% случаев отмечались следующие побочные реакции: явления астенизации, гипертермия, малопродуктивный кашель и легкий насморк. Чаще всего указанные реакции выявлялись на 3-й день ингаляций и купировались к концу курса без использования симптоматических средств.

На основании выявленных прогностически значимых факторов риска нами разработан алгоритм оптимизации клинико-иммунологической диагностики и лечения детей из групп риска, адаптированный к возможностям профильных ЛПУ и ДОУ.

Алгоритм состоит из 3 этапов, включающих:

1. Анкетный опрос с комплексной оценкой факторов риска и скрининг-диагностику с постановкой проб Манту с 2ТЕ и выявлением нарушений местного иммунитета.
2. Лабораторно-инструментальную диагностику с иммунологическим обследованием, дополненным определением уровня сывороточного и секреторного Лф, БАСК, а также ИЛ-6, -8, -10.
3. Этиотропное лечение с иммунореабилитацией и последующим иммуномониторингом в группах риска.

Предлагаемый алгоритм позволяет, с одной стороны, посредством комплексной оценки факторов риска провести целевой отбор детей в группы риска по туберкулёзу и инфицированию а, с другой стороны, реализовать направленную иммунокоррекцию и создать условия для закрепления положительного эффекта от специфической терапии путём устранения управляемых факторов риска.

## ВЫВОДЫ

1. На основании анализа частоты встречаемости социальных и медико-биологических факторов и оценки комплексных показателей факторов риска выделена группа детей с частыми эпизодами ОРЗ (ПО=3,4; ПУ=3), рецидивирующей респираторной патологией (ПО=6,8; ПУ=6,3) и аллергическими заболеваниями (ПО=5,1; ПУ=4,7), угрожаемых по инфицированию МБТ и заболеванию туберкулёзом. Комплексная оценка факторов риска позволяет не только определить риск возникновения туберкулёза, но выявить резервы защитных сил и направления профилактических мероприятий в группах риска.
2. Применение иммуноблоттинга способствует раннему выявлению туберкулёзного процесса у детей из групп риска в 27,3% случаев. Диагностическая чувствительность теста составляет 88,9% у больных туберкулёзом, а у детей контактных с больными туберкулёзом - 66,7%.
3. Бактерионосительство играет патогенетическую роль для персистенции микобактерии туберкулёза (ПУ=9,4), подавляя естественную резистентность слизистых оболочек верхнего отдела респираторного тракта за счёт высокой антилизоцимной активности патогенов ( $5,94 \pm 1,15$  мкг/мл).
4. Определение уровня лактоферрина, как индикатора состояния факторов естественной резистентности, позволяет выявить нарушения местного иммунитета у детей с риском развития туберкулёзной инфекции: напряжённость (ПО=22,5; ПУ=11,4), подавление (ПУ=13,4) и угнетение местного иммунитета (ПУ=17,2).
5. Особенностью цитокинового статуса у детей туберкулёзом внутригрудных лимфоузлов является гиперпродукция ИЛ-6,-8,-10 на фоне гиперлактоферринемии II (ПО=1,8) и III степени (ПО=1,9). В группах риска наиболее информативным является определение уровня ИЛ-8 и -6 с выявлением гиполактоферринемии (ПУ=2) и гиперлактоферринемии I степени (ПУ=2,1).
6. Прямые и опосредованные эффекты рекомбинантного ИЛ-2 (Ронколейкин®) способствуют санации бактерионосителей и позволяют не только корректировать иммунную недостаточность, но и повысить резерв факторов протекции у детей из групп риска.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Обязательным компонентом обследования детей из групп риска для выявления этиологически значимых факторов возникновения туберкулёзной инфекции рекомендуется включать анкетный опрос с последующей комплексной оценкой риска инфицирования или заболевания туберкулёзом.
2. Целесообразно дополнить алгоритм обследования детей из групп риска по туберкулёзу проведением иммуноблоттинга для ранней диагностики туберкулёзной инфекции, а у больных с «абациллярным туберкулёзом» – для подтверждения наличия специфического процесса.
3. Для определения вариантов изменений местного иммунитета в качестве скрининг-теста рекомендуется исследование уровня лактоферрина в секрете ротовой полости у детей в группах риска по туберкулёзу.
4. Для уточнения степени нарушения иммунного ответа на ранних этапах развития туберкулёзной инфекции рекомендуется исследование в сыворотке крови факторов естественной резистентности - уровня сывороточного лактоферрина, а также следующих цитокинов - ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10.
5. Для практического использования рекомендуется разработанный алгоритм оптимизации клинико-иммунологической диагностики и лечения с целью дифференцированного подхода к группам риска по туберкулёзу, который включает комплексную оценку факторов риска и протекции, скрининг-тесты, лабораторно-инструментальную диагностику и определение уровня ИЛ-6,-8,-10, сывороточного и секреторного лактоферрина с последующим этиотропным лечением и иммунореабилитацией.
6. С целью оптимизации схем иммунореабилитации детей из групп риска и больных туберкулёзом, рекомендуется включение в комплексное лечение курса рекомбинантного интерлейкина-2 (Ронколейкина) по схеме: ингаляционно, по оригинальному способу введения один раз в день, ежедневно по 0,125 мг, в течение 5 дней с лечебной целью и 3 дней - для профилактики.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Стахеева В.В.** Опыт применения рекомбинантного интерлейкина-2 у детей из групп риска по туберкулёзу в ДДУ г.Астрахани / **Стахеева В.В., Башкина О.А.**// *Международный журнал по иммунореабилитации.* - 2009. - Т.11. - №1. - С.123-124.
2. Динамика уровня лактоферрина в секрете ротовой полости при рецидивирующих респираторных заболеваниях у детей / Башкина О.А., **Стахеева В.В., Николаев А.А.** и др.// *Труды АГМА. Клинические вопросы современной медицины.*– 2003.- Т.29 (LIII). – С.80 – 88.
3. Этиологические и диагностические аспекты бактерионосительства / Бойко О.В., Николаев А.А., Луцкий Д.Л., Плосконос М.В., Гудинова Н.И., **Стахеева В.В.** // *Фундаментальные исследования.* – 2004. - №1.– С.40.
4. Клиническое значение определения концентрации лактоферрина в секрете ротовой полости при бронхиальной астме у детей / **Стахеева В.В., Башкина О.А., Дубина Д.Ш.** и др.// *Материалы II заочной электронной межвузовской научной конференции.* – Курск, 2005. – С. 51– 53.
5. Колебания факторов неспецифической резистентности у детей с рецидивирующей респираторной патологией на фоне санации бактерионосительства / **Стахеева В.В., Башкина О.А., Дубина Д.Ш.** и др.// *Человек и лекарство: Материалы XIII Российского национального конгресса.* – Москва, 2006. – С. 273 – 274.
6. Лактоферрин как показатель неспецифической резистентности организма в оценке состояния здоровья детей, проживающих в городе Астрахани / **Стахеева В.В., Башкина О.А., Дубина Д.Ш.** и др.// *Материалы V Всероссийской университетской научно-практической конференции молодых учёных и студентов по медицине.* – Тула, 2006. – С. 234 - 235.
7. Лактоферрин как индикатор состояния факторов неспецифической резистентности у детей при бронхолёгочной патологии /**Стахеева В.В., Дубина Д.Ш., Башкина О.А.**// *Достижения фундаментальных наук в решении актуальных проблем медицины: Материалы научно – практической конференции.* – Астрахань-Волгоград-Москва., 2006. – С.87 – 91.

8. Скрининг – диагностика нарушений местного иммунитета у детей дошкольного возраста, проживающих в г.Астрахани / **Стахеева В.В.**, Дубина Д.Ш., Башкина О.А. // Труды АГМА. Актуальные проблемы педиатрии.– 2006.-Т. 34 (XLIX).– С.65 - 68
9. Скрининг – диагностика нарушений местного иммунитета у детей из групп «риска» по туберкулёзу / **Стахеева В.В.**, Дубина Д.Ш., Башкина О.А. // Труды АГМА. Актуальные вопросы современной медицины.–2006.- Т. 33 (XLVII).– С.162 – 164.
10. Опыт применения метода иммуноблоттинга для диагностики туберкулёзной инфекции у детей дошкольного возраста из групп риска по туберкулёзу / **Стахеева В.В.**, Башкина О.А., Стрельцова Е.Н., Зулкарнеев Р.Ш. // Человек и лекарство: Материалы XVI Российского национального конгресса - Москва, 2009. – С. 262-263.
11. **Стахеева В.В.** Применение метода иммуноблоттинга для ранней диагностики туберкулёзной инфекции у детей из групп риска по туберкулёзу / **Стахеева В.В.**, Башкина О.А., Стрельцова Е.Н. и др.// Труды АГМА. Актуальные вопросы современной медицины.– 2009.-Т.40 (LXIV).– С.99-100.
12. **Стахеева В.В.** Новый подход в оздоровлении детей из групп риска по туберкулёзу в ДООУ г.Астрахани / **Стахеева В.В.**, Башкина О.А.// Вестник Российского Государственного Медицинского Университета. – 2010. - №2. - С.373.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АЛА – антилизоцимная активность  
БАСК – бактерицидная активность сыворотки крови  
ВДП – верхние дыхательные пути  
ДОУ – дошкольное образовательное учреждение  
ИЛ – интерлейкин  
ИФА – иммуноферментный анализ  
КАФ – количество активных фагоцитов  
Лф – лактоферрин  
ЛПУ – лечебно-профилактическое учреждение  
МБТ – микобактерии туберкулёза  
мкг/мл – микрограмм на миллилитр  
пг/мл – пикограмм на миллилитр  
ОСРЦ – областной социально-реабилитационный центр  
ПО – показатель опасности  
ПУ – показатель угрозы  
рИЛ-2 – рекомбинантный интерлейкин-2  
РПИФ – реакция прямой иммунофлюоресценции  
РПТИ – ранний период первичной туберкулёзной инфекции  
СОШ – средняя образовательная школа  
ТВГЛУ – туберкулёз внутригрудных лимфоузлов  
ЧБД – часто болеющие дети  
р – статистическая значимость различий  
г – коэффициент корреляции  
Th – Т-хелперы

СТАХЕЕВА Виктория Владимировна

**ОПТИМИЗАЦИЯ КЛИНИКО-  
ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ И  
ОЗДОРОВЛЕНИЕ ДЕТЕЙ ДОШКОЛЬНОГО  
ВОЗРАСТА ИЗ ГРУПП РИСКА  
ПО ТУБЕРКУЛЁЗУ**

**Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук**

Тираж 100 экз. Подписано в печать 12.10.11 г. Заказ №3102

Издательство ГБОУ ВПО «Астраханская государственная  
медицинская академия» Минздравсоцразвития РФ,  
414000, г.Астрахань, ул.Бакинская, 121